



PRÍNCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION

PROGRAMA DE DOCTORADO
SEÑALIZACIÓN CELULAR Y
PATOLOGÍAS ASOCIADAS
FACULTAD DE BIOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE VALENCIA

LABORATORIO DE BIOLOGÍA
CELULAR Y MOLECULAR
CENTRO DE INVESTIGACIÓN
PRÍNCIPE FELIPE

CONTRIBUCIÓN DE IGF-I EN LA HIPERPLASIA MAMARIA PROMOVIDA POR AIB1

Tesis Doctoral presentada por: Vanesa Señoret Molina
Director de Tesis Doctoral: Dr. Jaime Font de Mora Saínez
Tutor de Tesis Doctoral: Dr. Jose Enrique O'Connor Blasco

Valencia, 2015.

Dr. Jaime Font de Mora Saínz, investigador del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe.

INFORMA:

Que la presente Tesis Doctoral, titulada "CONTRIBUCIÓN DE IGF-I EN LA HIPERPLASIA MAMARIA PROMOVIDA POR AIB1", ha sido realizada bajo su dirección en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular del Centro de Investigación Príncipe Felipe de Valencia, por Doña Vanesa Señoret Molina, licenciada en Ciencias Biológicas por la Universidad de Valencia.

Revisado el presente trabajo, considera que cumple los requisitos necesarios para ser presentado ante el Tribunal constituido al efecto, para la obtención del grado de doctor.

Para que conste y surta los efectos oportunos, firma el presente documento.

Valencia, 30 de octubre de 2015.

Dr. Jaime Font de Mora Saínz

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a Jaime la oportunidad que me brindó de iniciar mi aventura en la investigación en aquel laboratorio vacío que nos esperaba en el antiguamente conocido como CSAT. Tras la Coca-Cola en ese bar cercano al Instituto de Investigaciones Citológicas, nunca creí que trabajaría en un grupo de investigación de Biología Molecular siendo yo una estudiante de Biología más bien zoóloga. Espero que no te arrepintieras ;). Gracias por las enseñanzas, las facilidades en poner los medios necesarios para nuestros experimentos, y por dejarnos llenar de florecillas aquel cristal opaco que quería parecerse a una ventana.

A mi grupo, el I-22. Con esas risas, esos momentos de histeria y ese RAP de AIB1 que solo unos pocos privilegiados pudieron escuchar ;) Desde Emma, mi primera compi y actual amiga. Cómo nos costó llenar el laboratorio de matraces, pipetas, aparatos varios.... No sabíamos por dónde empezar. Gracias por ayudarme con los genotipados de los primeros ratones. A Álvaro gracias por las risas compartidas comentando cada semana el capítulo de Muchachada Nui Nuiiii! Y por los truquillos que sabías para cada técnica. A Leo por ocuparte de mis ratoncillos cuando ya estaba trabajando en Castellón y por echarme una mano siempre que podías. A Joan, por ser un ejemplo de amabilidad, de educación y de constancia. A Maca, por tantas cosas compartidas que no podría nombrarlas aquí. Eres brillante, te imagino en unos años recogiendo un premio de su majestad Doña Leticia y dándole consejitos de moda de paso. Te deseo que seas muy feliz allá donde decidas vivir.

A mi Club de la Infu. Lucía, Santander nos unió en aquél maravilloso curso. Desde entonces nos hicimos "pareja" ¿recuerdas? Gracias por decirme que me fuera a casa cuando venías al laboratorio y me veías con los pelos de loca y fregando cacharros. Gracias por escucharme y preocuparte tanto por mí. Siempre estarás conmigo. A mi Lore, la voz de la sabiduría, la original, la que siempre ha sabido sacar lo mejor de mí y hacerme que yo lo viera. Gracias por ser mi amiga incluso en la distancia. ¡Y gracias por los peinados cuando teníamos algún evento!

Gracias a mis ratoncitos por dejarme trabajar con ellos sin darme nunca ningún mordisco.

Gracias a mi familia por estar ahí siempre. A mi madre por ser la hormiguita que con su trabajo hizo posible que pudiera llegar hasta aquí. A mi hermano Helí por ser el de las ideas rápidas y el que tiene solución para todo. A mi hermana Lorena por ser tú. Por llamarme tan a menudo aunque a mí se me vaya la cabeza. Por tantas risas y secretos compartidos. A Camilo, gracias por quererme tanto hermanito.

Gracias a mi última adquisición en mi cartera de amigos, Reyes. Sin tu paciencia y trabajo esta tesis no habría sido posible sobre todo en esta recta final. Gracias a Mavi por el apoyo y la sonrisa diaria. Y a Margarita por ponerte de vez en cuando en modo “mami” y cuidar de mí.

Por último, y más importante, gracias a Sergio, mi amigo, mi familia, mi compañero en la vida. Gracias por esperarme siempre, desde que nos conocimos. Esperarme cuando me retrasaba arreglándome, cuando el tren llegaba tarde de Valencia, esperar a que estuviera lista en cada momento de mi vida. Y esperarme hasta para escribir esta tesis, aquí conmigo hasta el último momento y mientras se nos hace de día. TE QUIERO.



ÍNDICE

ÍNDICE.....	III
ABREVIATURAS.....	IX
INTRODUCCIÓN.....	1
1. Anatomía y desarrollo de la glándula mamaria.....	3
2. Cáncer.....	11
2.1. Incidencia y factores de riesgo.....	11
2.2. Inicio y progresión tumoral.....	14
2.3. Modelos animales de estudio en cáncer.....	22
2.4. Cáncer de mama.....	26
3. AIB1.....	29
3.1. La familia de coactivadores transcripcionales p160.....	29
3.2. Funciones fisiológicas de AIB1.....	33
3.3. Papel de AIB1 en el inicio y progresión tumoral.....	42
3.3.1. Señalización dependiente de hormonas.....	44
3.3.2. Señalización independiente de hormonas.....	46
3.3.3. Influencia de AIB1 en genes supresores de tumores.....	48
3.3.4. Implicación de AIB1 en migración, invasión y metástasis....	49
3.3.5. Implicación de AIB1 en angiogénesis tumoral.....	51
3.3.6. Implicación de AIB1 en resistencia del tumor a quimioterapia y a terapia endocrina.....	52
3.3.7. Regulación de los niveles y actividad de AIB1.....	55
3.3.8. AIB1: potencial diana anticancerígena.....	58
4. Familia de factores de crecimiento tipo insulina (IGF).....	60
4.1. Componentes del sistema IGF.....	60
4.2. Estructura y función de IGF-IR.....	60
4.3. El sistema IGF en la glándula mamaria.....	64
5. Relación entre AIB1 y la ruta IGF-I/PI3K/AKT.....	66
OBJETIVOS.....	71
MATERIAL Y MÉTODOS.....	77
1. Experimentación animal.....	79
1.1. Modelos murinos.....	79

1.2. Estudio de angiogénesis <i>in vivo</i>	80
2. Análisis histológico. Tinciones.....	81
2.1. Análisis del ciclo estral mediante frotis vaginal.....	81
2.2. Tinción de mama completa con carmín aluminio.....	82
2.3. Inmunohistoquímica.....	83
2.4. Inmunofluorescencia.....	85
3. Análisis morfométrico de la glándula mamaria.....	86
3.1. Penetración ductal.....	86
3.2. Penetración ductal relativa.....	86
3.3. Porcentaje de ocupación epitelio/estroma.....	87
3.4. Ramificación ductal.....	87
4. Cultivos celulares.....	88
4.1. Línea celular humana HMEC.....	88
4.2. Cultivos primarios de glándula mamaria de ratón (MMEC).....	89
5. Sobreexpresión y silenciamiento de genes.....	91
6. Determinación del ciclo celular y de la proliferación.....	91
6.1. Citometría de flujo en MMECs.....	91
6.2. Citometría de flujo en HMECs.....	92
6.3. Ensayo de proliferación celular MTT.....	93
7. Técnicas con DNA.....	94
7.1. Extracción de DNA.....	94
7.2. Genotipado de los ratones.....	94
7.3. Comprobación de la delección en Igf1r en DNA genómico.....	95
8. Técnicas con RNA.....	96
8.1. Extracción de RNA.....	96
8.2. RT-PCR semicuantitativa.....	97
8.3. RT-PCR en tiempo real.....	98
9. Técnicas con proteínas.....	99
9.1. Extracción de proteínas.....	99
9.2. Inmunotransferencia de proteínas.....	100
10. Medida de actividad transcripcional: gen reportero luciferasa.....	101

11. Análisis estadístico de datos.....	102
RESULTADOS.....	105
1. Generación y análisis del fenotipo de ratones con inactivación específica de IGF-IR y sobreexpresión de AIB1 en la glándula mamaria (ratones IGF-IR^{GMKO}/tgAIB1).....	107
1.1. Generación de ratones WT, tgAIB1, IGF-IR ^{GMKO} , IGFIR ^{GMKO} /tgAIB1.....	107
1.2. Análisis del fenotipo de la glándula mamaria en ratones WT, tgAIB1, IGF-IR ^{GMKO} , IGF-IR ^{GMKO} /tgAIB1. Descubrimiento de la existencia de ratones <i>Igf1r</i> ^{loxP/ΔExón 3}	111
1.3. Cambio en la estrategia de los cruces establecidos para la generación de ratones WT, tgAIB1, IGF-IR ^{GMKO} , IGF-IR ^{GMKO} /tgAIB1.....	118
1.4. Análisis del fenotipo de la glándula mamaria en ratones WT, tgAIB1, IGF-IR ^{GMKO} , IGF-IR ^{GMKO} /tgAIB1.....	120
1.4.1. Análisis mediante tinción de mama completa.....	120
1.4.2. Análisis morfométrico.....	123
1.5. Análisis histológico de la glándula mamaria de ratones WT, tgAIB1, IGF-IR ^{GMKO} , IGF-IR ^{GMKO} /tgAIB1.....	127
1.5.1. Expresión de la proteína IGF-IR en el epitelio de la glándula mamaria de ratones IGF-IR ^{GMKO}	127
1.5.2. Expresión del marcador de proliferación PCNA en el epitelio de la glándula mamaria de ratones WT, tgAIB1, IGF-IR ^{GMKO} , IGF-IR ^{GMKO} /tgAIB1.....	131
1.6. Análisis celular de la glándula mamaria de ratones WT, tgAIB1, IGF-IR ^{GMKO} , IGF-IR ^{GMKO} /tgAIB1.....	133
1.6.1. Obtención de cultivo primario de células epiteliales de mama de ratón (MMEC, <i>Mouse Mammary Epithelial Cell</i>).....	133
1.6.2. Estudio del ciclo celular en cultivo primario de células epiteliales de mama de ratón (MMEC).....	136

1.7. Validación de los resultados obtenidos con el modelo animal en una línea celular humana.....	137
2. Estudio de la actividad angiogénica promovida por AIB1 en la glándula mamaria.....	143
2.1. Análisis de la expresión de VEGF y VEGFR2 en glándulas mamarias de ratones WT y tgAIB1.....	144
2.2. Estudio in vivo de la angiogénesis en la glándula mamaria de ratones tgAIB1/VEGFR2-Luc.....	144
2.3. Análisis tisular de la angiogénesis promovida por AIB1 en la GM de ratones tgAIB1/VEGFR2-Luc.....	149
DISCUSIÓN.....	155
CONCLUSIONES.....	169
BIBLIOGRAFÍA.....	175

ABREVIATURAS

ACTR	<i>Acetyltransferase</i>	Molécula activada acetiltransferasa del receptor de hormona tiroidea 1
AD-1	<i>Activation Domain 1</i>	Dominio de activación 1
AD-2	<i>Activation Domain 2</i>	Dominio de activación 2
AEBSF	<i>4-(2-Aminoethyl) Benzenesulfonyl Fluoride</i>	4-(2-aminoetil) bencenosulfonyl fluoruro
AIB1	<i>Amplified In Breast Cancer 1</i>	Amplificado en cáncer de mama 1
AKT/PKB	<i>Protein kinase B</i>	Proteína quinasa B
ALFP	<i>Albumin/Alpha-FetoProtein</i>	Albúmina/alfafetoproteína
ALS	<i>Acid-labile subunit</i>	Subunidad ácida lábil
AP-1	<i>Activator Protein 1</i>	Proteína activadora 1
APC	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>	Poliposis adenomatosa de colon
AR	<i>Androgen receptor</i>	Receptor de andrógenos
ATP	<i>Adenosine Triphosphate</i>	Adenosina trifosfato
Bcl-2	<i>B-cell Lymphoma 2</i>	Gen del linfoma de células B 2
bHLH	<i>Basic Helix-Loop-Helix</i>	Básico hélice-vuelta-hélice
BLG	<i>β-Lactoglobulin</i>	β -lactoglobulina
BRCA1	<i>Breast Cancer 1</i>	Gen del cáncer de mama 1
BRCA2	<i>Breast Cancer 2</i>	Gen del cáncer de mama 2
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>	Seroalbúmina bovina
C/EBP	<i>CCAAT/enhancer-binding protein</i>	Proteína de unión a región promotora CCAAT
CARM-1	<i>Coactivator-associated Arginine Methyltransferase 1</i>	Metiltransferasa de coactivadores asociados a arginina
CBP	<i>CREB Binding Protein</i>	Proteína de unión a CREB
CCSP	<i>Clara Cell Secretory Protein</i>	Proteína de secreción de las células Clara de pulmón

ABREVIATURAS

Cdk2	<i>Cyclin-dependent kinase 2</i>	Quinasa dependiente de ciclina 2
cDNA	<i>Complementary Deoxyribonucleic acid</i>	Ácido desoxirribonucleico complementario
CK1δ	<i>Casein kinase 1</i>	Caseína quinasa 1δ
CMV	<i>Cytomegalovirus</i>	Citomegalovirus
CREB	<i>cAMP Response Element Binding Protein</i>	Proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP
ChIP	<i>Chromatine Immunoprecipitation</i>	Inmunoprecipitación de cromatina
DAPI	<i>4',6-Diamidino-2-phenylindole</i>	4',6-diamidino-2-fenilindol
DBD	<i>DNA Binding Domain</i>	Dominio de unión a DNA
DE	<i>SD, Standard deviation</i>	Desviación estándar
DMBA	<i>7,12-Dimethylbenz(a)anthracene</i>	7,12-Dimetilbenz(a)antraceno
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	Medio Eagle modificado Dulbecco
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>	Ácido desoxirribonucleico
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EMT	<i>Epithelial- Mesenchymal Transition</i>	Transición epitelio-mesénquima
ER	<i>Estrogen Receptor</i>	Receptor de estrógenos
ERH		Elemento de respuesta a hormonas
ERK	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>	Quinasa regulada por señales extracelulares
FAK	<i>Focal Adhesion kinase</i>	Quinasa de adhesión focal
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>	Suero bovino fetal

FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>	Factor de crecimiento fibroblástico
GM	<i>Mammary Gland</i>	Glándula mamaria
GRIP	<i>Glucocorticoid Receptor Interacting Protein</i>	Proteína de interacción con el receptor de glucocorticoides
HIF	<i>Hypoxia inducible factor</i>	Factor inducido por hipoxia
HUVEC	<i>Primary Human Umbilical Vein Endothelial Cell</i>	Células endoteliales humanas de cordón umbilical
IDH	<i>Isocitrate dehydrogenase</i>	Isocitrato deshidrogenasa
IGF	<i>Insulin like Growth Factor</i>	Factor de crecimiento tipo insulina
IGFBP	<i>Insulin like Growth Factor Binding Protein</i>	Proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulina
IGF-IR	<i>Insulin like Growth Factor I Receptor</i>	Receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1
IR	<i>Insulin Receptor</i>	Receptor de insulina
IRS	<i>Insulin Receptor Substrate</i>	Sustrato del receptor de insulina
K14	<i>Keratin 14</i>	Queratina 14
KDa	<i>Kilodalton</i>	Kilodalton
LBD	<i>Ligand Binding Domain</i>	Dominio de unión a ligando
LKB1	<i>Serine-Threonine Liver Kinase B1</i>	Serina -treonina quinasa B1 hepática
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>	Proteína quinasa activada por mitógenos
MIF	<i>Macrophage Migration Inhibitory Factor</i>	Factor inhibidor de la migración de macrófagos
MMP	<i>Matrix MetalloProtease</i>	Metaloproteasa
MMTV	<i>Mouse Mammary Tumors Virus</i>	Virus del tumor mamario del ratón
NCC	<i>Non Compaction Cardiomyopathy</i>	Cardiomiopatía no compactada

ABREVIATURAS

NCoA	<i>Nuclear receptor Coactivator</i>	Coactivador de receptor nuclear
NF2	<i>Neurofibromin 2</i>	Neurofibromatosis 2
NF- κ B	<i>Nuclear Factor kappa B</i>	Factor nuclear kappa B
PAS	<i>Per, Arnt y Sim de Drosophila</i>	Per, Arnt y Sim de Drosophila
PB	<i>Probasin Promoter</i>	Promotor de la probasina
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>	Tampón fosfato salino
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>	Reacción en cadena de la polimerasa
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-3-Kinases</i>	Fosfatidil-inositol-3 quinasa
PR	<i>Progesterone Receptor</i>	Receptor de progesterona
RN		Receptor nuclear
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>	Ácido ribonucleico
rpm	<i>revolutions per minute</i>	revoluciones por minuto
RTH	<i>Resistance to Thyroid Hormone</i>	Resistencia a hormona tiroidea
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase PCR</i>	Reacción retrotranscriptasa seguida de PCR
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>	Docecil sulfato sódico
SRC	<i>Steroid Receptor Coactivator</i>	Coactivadores de receptores esteroideos
TDLU	<i>Terminal Lobular Ductal Unit</i>	Unidad ducto-lobulillar terminal
TEB	<i>Terminal End Bud</i>	Yema terminal
TEMED	<i>Tetramethylethylenediamine</i>	Tetrametiletilenodiamina
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>	Factor de necrosis tumoral
TR	<i>Thyroid Receptor</i>	Receptor de la hormona tiroidea
TRAM1	<i>Thyroid Hormone Receptor Activated Molecule 1</i>	Molécula activadora del receptor de hormonas tiroideas 1
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>	Factor de crecimiento endotelial vascular

VEGFR1	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1</i>	Receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular
VEGFR2	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2</i>	Receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular
WAP	<i>Whey Acidic Protein</i>	Proteína ácida del suero de la leche
WT	<i>Wild Type</i>	Cepa silvestre

INTRODUCCIÓN

1. Anatomía y desarrollo de la glándula mamaria

La glándula mamaria es un órgano característico de los mamíferos que tiene como función principal producir leche para alimentar a las crías después del nacimiento. La aparición de la glándula mamaria en la escala evolutiva filogenética se produjo hace aproximadamente 200 millones de años de manera divergente en los mamíferos (Hennighausen and Robinson 1998). De hecho, la secreción de leche es una de las actividades fisiológicas más antiguas en los mismos. Diversos estudios han evidenciado que tanto la aparición de las glándulas mamarias como la producción de leche se deben a una evolución del sistema inmune innato (Daniel and Smith 1999; Goldman, Chheda, Garofalo 1998; Vorbach, Capecchi, Penninger 2006). El número y localización de las glándulas mamarias varía entre diferentes clases de animales. En el ratón existen 5 pares de glándulas, de las cuales un par está localizada en la región cervical, dos pares están situadas en la zona torácica y los otros dos pares se ubican en la región abdominal/inguinal (**Figura 1**).

El desarrollo mamario del ratón comienza poco después de la mitad de la gestación, con la formación de dos ejes bilaterales ectodérmicos o líneas lactíferas en la parte ventral del feto. Cada una de estas líneas se divide en 5 placodas que se sitúan donde estará el futuro pezón. Cada placoda crece y se invagina penetrando en el mesénquima formando una yema que será la mama primaria rudimentaria. El brote mamario crece hasta alcanzar el estroma, donde comienza a bifurcarse.

El ratón recién nacido tiene un sistema rudimentario de pequeños ductos que va creciendo lentamente hasta el comienzo de la pubertad, aproximadamente a las tres semanas de edad. En este momento bajo la influencia de las hormonas ováricas (estrógeno y progesterona) los ductos empiezan a crecer y ramificarse más rápidamente. En esta fase aparecen unas estructuras especiales, las yemas terminales (TEBs) al final de los ductos, que son las que irán penetrando en el estroma. La bifurcación de las yemas terminales va formando nuevos ductos

primarios y secundarios. Sin embargo, la ramificación lateral o terciaria se genera en los ductos maduros (Sternlicht et al. 2006).

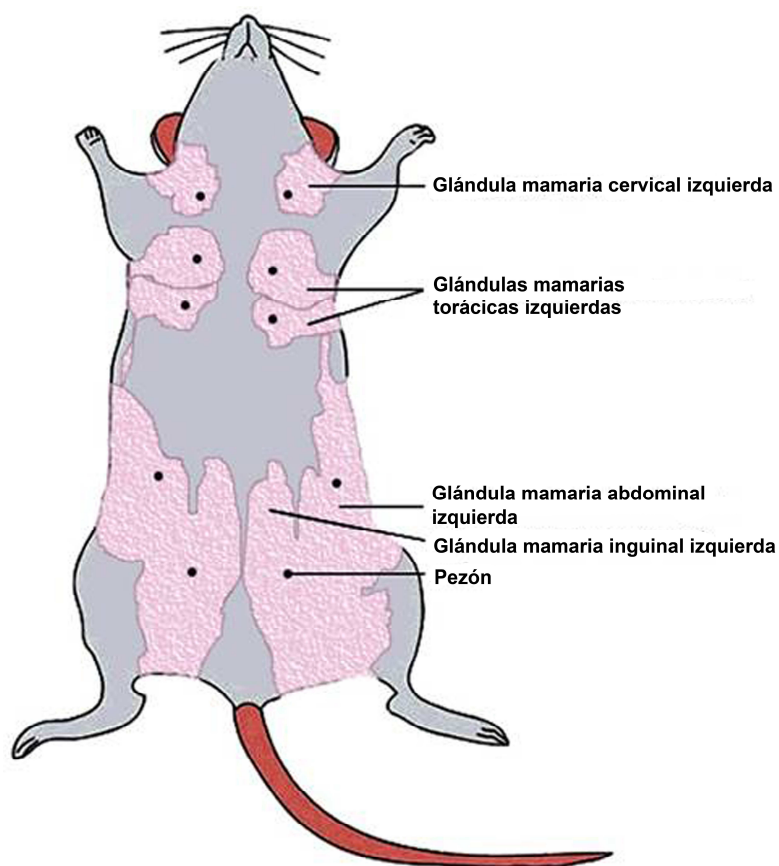


Figura 1. Esquema anatómico de la localización de las glándulas mamarias en el ratón (diagrama ventral). En la hembra de ratón existen 5 pares de glándulas mamarias. Las cervicales son las más pequeñas. Las glándulas abdominales e inguinales son las más desarrolladas y las que usualmente se emplean para estudios morfológicos. También se les denomina mediante números, siendo el #1 la mama cervical izquierda, continuando hacia la parte posterior del animal hasta llegar al #5 (glándula inguinal izquierda). Después se continúa numerando la parte derecha de igual modo, siendo la mama #6 la cervical derecha y la #10 la inguinal derecha. (Conti et al. 2004).

Hacia el final de la pubertad, a las 8-10 semanas aproximadamente, el estroma está completamente invadido por los ductos y la mayoría de las yemas ha desaparecido (Richert et al. 2000). Durante el embarazo ocurre una ramificación ductal extensa y un crecimiento de los alveolos terminales, que culmina con el parto. La diferenciación final del epitelio alveolar se completa al final de la gestación con el comienzo de la lactancia. Tras el destete, el epitelio alveolar sufre apoptosis y la glándula mamaria es remodelada hasta alcanzar, en unas pocas semanas, la apariencia de una mama de una hembra virgen, en un proceso denominado involución (Hennighausen and Robinson 2005). (**Figura 2**).

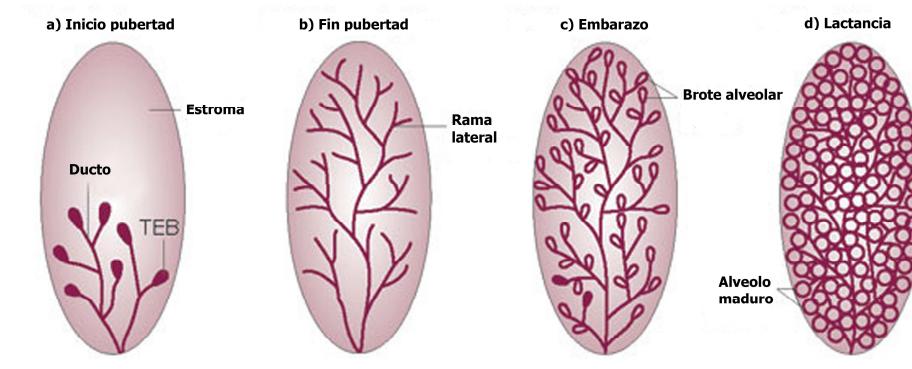


Figura 2. Diagrama de los diferentes estadios durante el desarrollo de la glándula mamaria en el ratón. a) Inicio de la pubertad: los ductos se elongan y se forman las yemas terminales (TEBs). b) Fin de la pubertad: los ductos se han elongado y ramificado ocupando todo el estroma. c) Embarazo: se forman los alveolos al final de los ductos. d) Lactancia: el epitelio de los alveolos se diferencia y madura para producir leche (Hennighausen and Robinson 2005).

En la hembra adulta la glándula mamaria cambia cíclicamente con cada ciclo estral, de un modo similar pero no tan drástico a lo mostrado en la **Figura 2** entre una mama vírgen y una de una hembra gestante. El ciclo estral en ratón dura cuatro días y está formado por 4 fases: proestro, estro, metaestro y diestro, reguladas por las hormonas ováricas. Al final de cada ciclo estral, se induce la

formación de ramificaciones laterales terciarias con yemas alveolares en los extremos, que desaparecen con el próximo ciclo si no hay gestación. Este remodelado morfológico se acompaña de proliferación celular y apoptosis (Fata, Chaudhary, Khokha 2001).

La glándula mamaria está compuesta por el estroma mamario (formado por adipocitos, fibroblastos, macrófagos y células endoteliales) y por el tejido epitelial, que presenta una estructura ductal con una capa interna de células lumbinales ductales rodeada por una capa externa de células basales mioepiteliales. Las células lumbinales ductales rodean un lumen central, y al final de la gestación se diferencian a células lumbinales alveolares. Las células mioepiteliales rodean a las células lumbinales, separando las estructuras epiteliales propiamente dichas del compartimento estromal. Las células mioepiteliales son las encargadas de secretar los componentes de la membrana basal, y durante la lactancia tienen una función contráctil, eyectando la leche desde los alveolos a los ductos (Richert and Wood 1999). Las yemas terminales (TEBs) están compuestas por una capa externa de células epiteliales denominadas *cap cells* y varias capas internas de células cuboidales denominadas *body cells*, que son las células pre-lumbinales. Las *cap cells* son capaces de diferenciarse tanto a célula mioepitelial como a ductal una vez que migran a las capas internas de la yema terminal. Sin embargo, las *body cells* darán lugar a células ductales diferenciadas. Las yemas terminales, lugar donde existe mayor proliferación mamaria, no presentan tejido conectivo ni células mioepiteliales a su alrededor, lo que facilita la invasión del estroma en la elongación ductal (Sternlicht et al. 2006) (**Figura 3**).

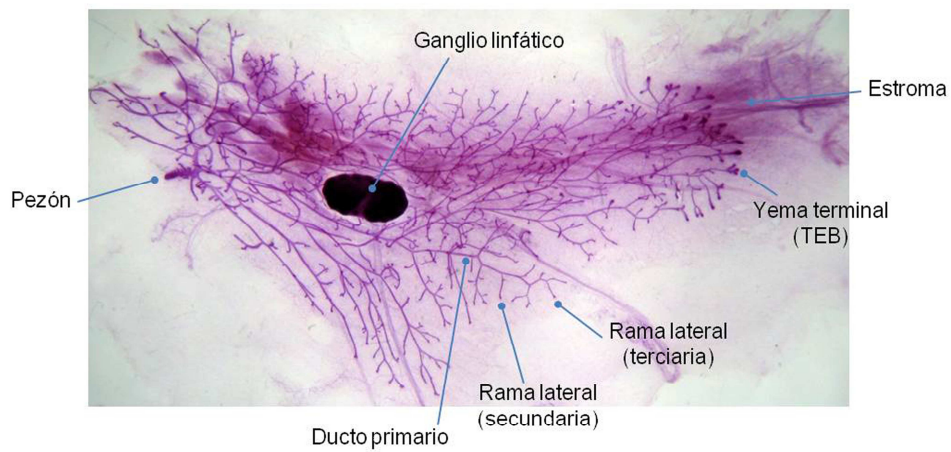
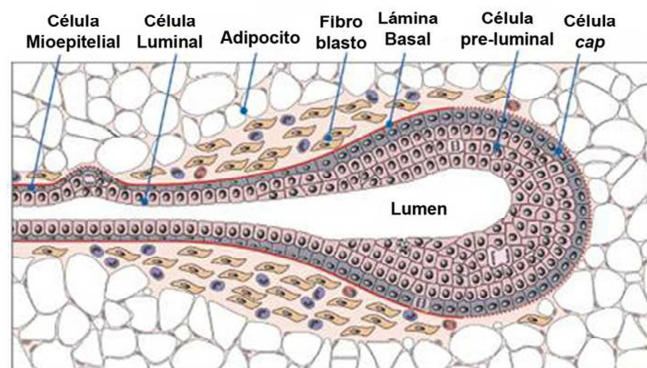
A**B**

Figura 3. Estructura de la glándula mamaria de una hembra de ratón en la mitad de la pubertad. A) Tinción de mama total con carmín aluminio de la glándula mamaria abdominal izquierda de una hembra de 7 semanas de edad. Fotografía propia. B) Diagrama de la composición celular de una yema terminal (TEB). Adaptada de (Sternlicht et al. 2006).

La mama en humanos está constituida por múltiples ductos y lóbulos rodeados por tejido conjuntivo y tejido adiposo que dan consistencia a la mama, y por vasos sanguíneos y linfáticos (**Figura 4**).

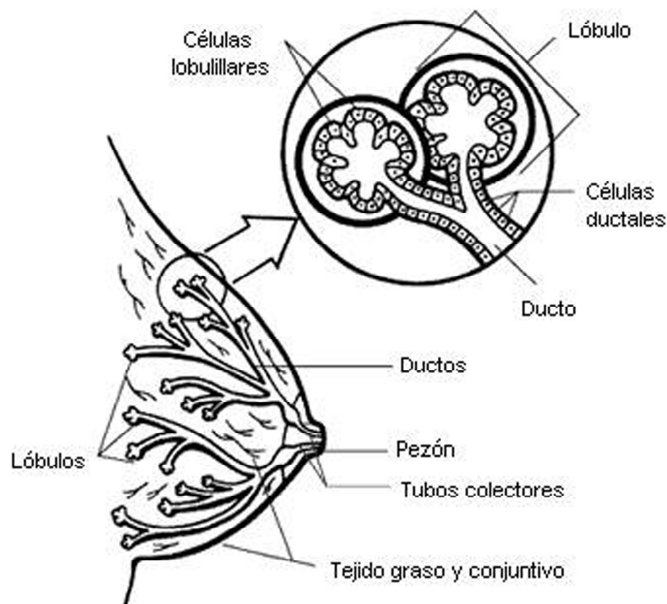


Figura 4. Diagrama de una glándula mamaria humana. Se muestra la estructura de una mama humana adulta en reposo, no gestante. La magnificación muestra la forma de los lóbulos en detalle. Imagen tomada de www.infocancer.org.mx (2008).

El desarrollo de la glándula mamaria en humanos se inicia durante la fase embrionaria en el primer trimestre de gestación, dando lugar a un par de placodas (Howard and Gusterson 2000) , las cuales se desarrollan de forma similar a las de los ratones hembras, sin que exista dimorfismo sexual. A diferencia de lo que ocurre en los ratones, en la mama humana no hay un único árbol ductal, sino que está formada por varios árboles que confluyen en el pezón. El alargamiento y la amplificación de esta estructura ramificada se producen en la 5ª semana de

gestación. En el segundo trimestre se forman los esbozos que darán lugar a los ductos galactóforos que van a desembocar en el pezón. Tras el nacimiento, solamente un árbol ductal rudimentario está presente, dándose un proceso similar a la involución que sucede después de la lactancia (Sternlicht et al. 2006). Este sistema rudimentario ramificado de ductos permanecerá quiescente hasta la pubertad. Entonces comienza un proceso de ramificación intensivo y de expansión del estroma, y se forman las unidades que conforman la estructura básica de la mama humana, la unidad ducto-lobulillar terminal (TDLU). Durante los ciclos menstruales se producirán cambios en los niveles de hormonas ováricas necesarias para el crecimiento continuo y progresivo de la mama. Además de estas hormonas están implicadas otras como la prolactina (PRL), insulina, cortisol y la hormona del crecimiento (GH) (Macias and Hinck 2012). Durante el desarrollo mamario la acción de estas hormonas en el epitelio mamario estará complementada con la de factores de crecimiento como el factor de crecimiento tipo insulínico 1 (IGF-I) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF).

Durante el embarazo, el epitelio prolifera y se diferencia para formar estructuras secretoras de leche llamadas alveolos (Russo et al., 1990). Tras el parto y durante la lactancia, la mama humana está formada por 15-20 ductos galactóforos que confluyen en el pezón. Tras la lactancia se desencadena un proceso de involución mamario similar al que sucede en ratones, con una fase de apoptosis y otra de degradación proteolítica de la membrana basal que da lugar a un remodelado de la glándula donde el tejido adiposo vuelve a ocupar el espacio que ocuparon las estructuras lóbulo-alveolares durante el embarazo (Lund et al. 1996) (**Figura 5**).

La glándula mamaria es un órgano en constante evolución postnatal, desde la adolescencia al embarazo, la lactancia y la posterior involución. Incluso se pueden observar pequeñas diferencias según las distintas fases del ciclo menstrual. Por lo tanto, la proliferación, apoptosis y diferenciación de las células epiteliales que forman parte de la glándula mamaria deben estar estrictamente reguladas.

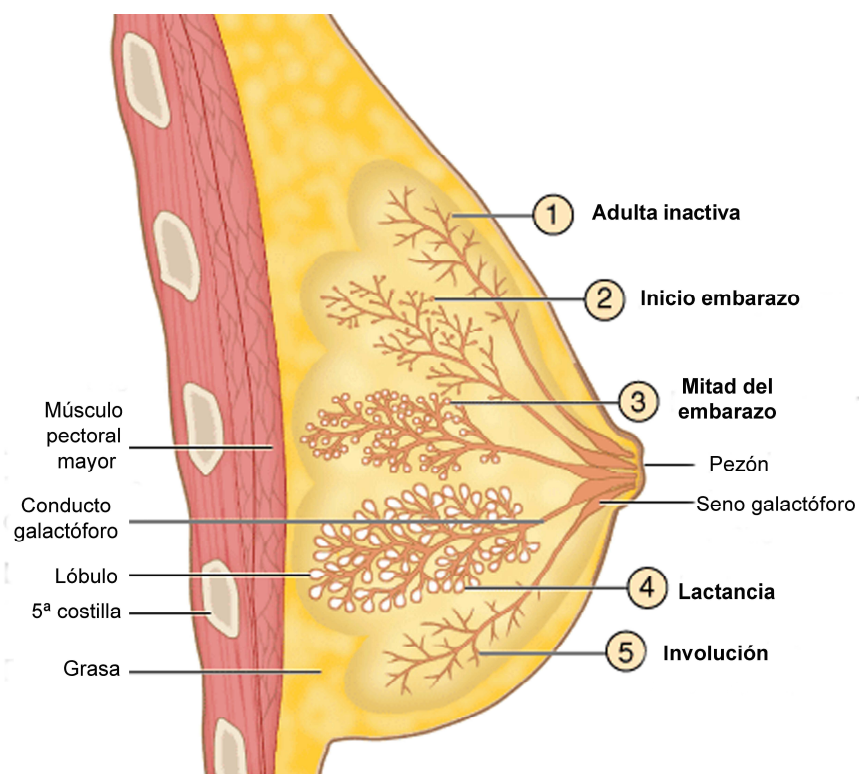


Figura 5. Ilustración de las diferentes etapas del desarrollo de la glándula mamaria humana. 1) Mujer adulta no gestante: existe ramificación ductal. 2) Inicio del embarazo: comienza la proliferación y diferenciación epitelial. 3) Segundo trimestre de embarazo: desarrollo de estructuras secretoras y expansión del sistema lobulillo-alveolar. 4) Lactancia: formación de lóbulos y conducto galactóforos. 5) Involución: recuperación de la estructura inactiva tras el destete (Mescher 2009).

2. Cáncer

2.1 Incidencia y factores de riesgo.

La palabra cáncer es un término que engloba a más de 200 enfermedades caracterizadas por el desarrollo de células anormales, que se dividen y crecen sin control en cualquier parte del cuerpo. Cada tipo de cáncer posee características particulares, que en algunos casos son completamente diferentes al resto, y tiene su propia causa, evolución y tratamiento específico. La proliferación celular descontrolada da lugar a la formación de tumores o nódulos, que pueden benignos o malignos. Cuando las células que constituyen dicho tumor no poseen todavía la capacidad de invadir su entorno, hablamos de tumores benignos. En este caso las células proliferan en el lugar donde se inició el tumor. Pero cuando estas células sufren nuevas alteraciones y adquieren la capacidad de invadir el estroma (infiltración), y de trasladarse y proliferar en otras partes del organismo (metástasis), hablamos de tumor maligno, y es clasificado como cáncer.

Los cánceres se pueden clasificar según el tejido que les dio origen:

- Carcinomas. Se originan a partir de células epiteliales que tapizan la superficie de órganos, glándulas o estructuras corporales. Representan más del 80% de la totalidad de los cánceres.
- Sarcomas. Son cánceres que se forman a partir del llamado tejido conectivo o conjuntivo, del que derivan los músculos, los huesos, los cartílagos o el tejido graso. Los más frecuentes son los sarcomas óseos.
- Leucemias. Son cánceres hematológicos que se originan en células precursoras de células sanguíneas y ubicadas en la médula ósea, tejido encargado de mantener la producción de glóbulos rojos, blancos y plaquetas. Las alteraciones en estas células pueden producir, respectivamente, anemia, infecciones y alteraciones de la coagulación (sangrados o trombosis).
- Linfomas. Se desarrollan a partir del tejido linfático, como el existente en ganglios y órganos linfáticos.

La incidencia global del cáncer sigue en aumento al igual que la mortalidad asociada a esta enfermedad. Según el último informe de la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC), organismo de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la incidencia global anual del cáncer es de 14,1 millones, siendo la tasa de mortalidad anual de 8,2 millones (Ferlay et al. 2015). En Europa el número de casos nuevos detectados en un año fue de 3,45 millones, y la mortalidad asociada de 1,75 millones. Con estos datos, el cáncer representa uno de los problemas sanitarios más importantes en Europa. Los tipos de cáncer más comunes fueron mama, colon, próstata y pulmón, representando aproximadamente el 50% de todos los cánceres detectados. Los más letales fueron pulmón, colon, mama y estómago (Ferlay et al. 2013). En 2014 el cáncer fue la segunda causa de muerte en ambos sexos en España (según el INE, Instituto Nacional de Estadística), solo superado por las defunciones debidas a problemas circulatorios.

Además de tratar de erradicar la enfermedad una vez detectada, la estrategia ideal es la prevención. Por este motivo, es necesario conocer los agentes desencadenantes del cáncer, ya sean externos o inherentes al individuo, ya que el riesgo de sufrir cáncer depende de una combinación de factores ambientales así como de la predisposición genética de cada persona. La historia genética es una parte esencial de cada paciente y su conocimiento puede ayudar a la detección temprana del cáncer en individuos de alto riesgo. Aproximadamente el 10-20% de los cánceres se desarrollan en personas con historia familiar de cáncer. En estos casos, las mutaciones son transmitidas de unas generaciones a otras, situación denominada cáncer hereditario. Muchos de los genes mutados son genes supresores de tumores que están asociados con frecuencia a cánceres en un tejido específico, como por ejemplo BRCA1 y BRCA2 en mama y ovario (Radice 2002), APC en colon (poliposis adenomatosa familiar) (Fodde 2002), RB1 en la retina (retinoblastoma) (Richter et al. 2003).

Otro factor de riesgo importante es la edad (Bao et al. 2014). La acumulación de lesiones genéticas a lo largo de los años hace que con la edad aumente la probabilidad de padecer cáncer. De hecho, el aumento en la

expectativa de vida, el envejecimiento poblacional, es el motivo del enorme incremento en la incidencia de cáncer en nuestra sociedad.

En cuanto a los factores ambientales relacionados con la aparición del cáncer, existen varios agentes desencadenantes identificados a través de estudios poblacionales de incidencia geográfica del cáncer, exposición a carcinógenos y hábitos de vida. Por un lado, numerosos agentes químicos ambientales se han asociado al riesgo de padecer ciertos tipos de cáncer: bencenos (leucemias) (Snyder 2012), asbestos (cáncer de pulmón) (Liu, Cheresh, Kamp 2013), anilinas (cáncer de vejiga) (Carreon et al. 2010), etc.

La exposición prolongada a radiaciones de baja energía como la ultravioleta del sol se ha asociado a riesgo de padecer cáncer de piel (Ananthaswamy 2001).

Algunas infecciones virales pueden contribuir al desarrollo del cáncer, como el virus del papiloma humano en cáncer de cérvix (Schiffman et al. 2007) o de orofaringe (Lewis et al. 2015), el virus de Epstein-Barr en linfomas (Flavell and Murray 2000) o el virus de la hepatitis B en cáncer hepático (Kremsdorf et al. 2006).

Algunas infecciones bacterianas también se han asociado a cáncer. El caso mejor documentado es la infección por *Helicobacter pylori*, una bacteria que infecta el estómago ocasionando úlceras, y cuya presencia se ha asociado al desarrollo de cáncer de estómago (Dalal and Moss 2014).

Por último, según la OMS, cerca de la mitad de los cánceres se producen a causa de factores absolutamente evitables, relacionados con ciertos hábitos como el consumo de tabaco y alcohol y con estilos de vida sedentarios y dietas pobres en frutas y verduras que favorecen la obesidad. En primer lugar el tabaco representa el principal carcinógeno ambiental conocido para padecer cáncer, siendo la primera causa de cáncer de pulmón, y un factor importante en otros cánceres como los de cabeza y cuello, esófago, estómago, páncreas (Gandini et al. 2008). El consumo de alcohol en cantidades abundantes se asocia a un riesgo aumentado de diversos tipos de cáncer, particularmente de cavidad oral, laringe y esófago (Ahmad Kiadaliri et al. 2013). Múltiples evidencias sugieren que

los hábitos alimentarios y de estilo de vida se relacionan con el riesgo de cáncer, en concreto la obesidad y la inactividad física (Roberts, Dive, Renehan 2010). En general se recomienda una dieta baja en grasas y calorías, pues poblaciones habituadas al consumo de carne y bajo contenido en frutas y verduras padecen un aumento de riesgo de cáncer, sobre todo de colon. Dentro de esta recomendación general, desgraciadamente es imposible una mayor precisión. Resulta muy difícil identificar cuáles son los componentes precisos de la dieta que aumentan o disminuyen el riesgo. Igualmente se recomienda la práctica rutinaria del ejercicio físico.

2.2 Inicio y progresión tumoral.

La transformación de una célula normal en una célula maligna (tumorigénesis) es un proceso que requiere de la acumulación progresiva de alteraciones genéticas que confieren a las células cancerosas ventajas proliferativas (Hanahan and Weinberg 2011). Se considera que existen una serie de etapas necesarias en la génesis del cáncer que normalmente ocurren a lo largo de varias décadas. El primer paso en la carcinogénesis consiste en la acción de un agente iniciador, que ocasiona una mutación en el DNA. A veces esta mutación es congénita, heredada y ello posibilita que el cáncer se desarrolle más precozmente, ya que bastaría un menor número de mutaciones adquiridas en la vida. En otras ocasiones, la causa se halla en factores externos, como los anteriormente citados. Un segundo paso es inducido por la exposición a un agente promotor, que aprovechando la ventaja proliferativa otorgada por la primera alteración, estimula las células a dividirse. Los agentes promotores de nuevo pueden ser congénitos, adquiridos o externos. En un tercer paso que induce a la progresión tumoral, nuevas alteraciones genéticas y/o cambios epigenéticos confieren capacidades invasivas y metastatizantes. Sin este último paso el tumor puede permanecer benigno y localizado. En esta fase el ambiente que rodea a la célula tumoral cambia radicalmente. El tumor instaura sus sistemas de crecimiento autónomo, promoviendo señales de crecimiento. Además destruye la membrana basal y la

matriz extracelular para abrirse camino hacia los vasos sanguíneos y linfáticos facilitando la metástasis. Por otra parte, con el fin de conseguir su propio aporte de nutrientes, el tumor promueve la formación de un sistema de vasos sanguíneos propios (angiogénesis tumoral). En todo este proceso pueden verse implicadas distintas estirpes celulares. La presencia en el tumor de células madre transformadas o tumorales es determinante en la agresividad y resistencia del cáncer a los diferentes tratamientos. Esta es la teoría clásica del inicio del cáncer, la que se basa en la acumulación paulatina de mutaciones. Sin embargo, recientemente se ha descrito un nuevo fenómeno denominado cromotripsis, por el cual el desarrollo del cáncer aparecería repentinamente debido a un único evento cromosómico catastrófico, que provocaría decenas a cientos de mutaciones. Este fenómeno explicaría el 25% de los cánceres de hueso. El patrón de los daños sufridos en el genoma sugiere que la cromotripsis se produce durante la división celular, momento en el que los cromosomas son mucho más compactos de lo habitual. Se sospecha que la causa puede ser la radiación ionizante (Stephens et al. 2011). Los genes que se ven afectados por estas mutaciones causantes del cáncer pueden ser de distintos tipos:

- Los proto-oncogenes son genes estimuladores de la proliferación celular. Los oncogenes son versiones anómalas, patológicas de los proto-oncogenes que presentan ganancia de función.
- Los genes supresores de tumores son capaces de evitar la transformación de una célula normal en una célula cancerígena mediante reparación del DNA, inhibición de la proliferación celular y estimulación de la apoptosis. Por este motivo suelen presentar una pérdida de función en cáncer.

Se ha descrito que las células cancerosas comparten una serie de características comunes, unas capacidades biológicas adquiridas durante el desarrollo del tumor que regulan rutas de señalización celulares, las cuales confluyen en la inestabilidad cromosómica que posibilita la adquisición de nuevas mutaciones y la propagación del tumor (Hanahan and Weinberg 2011). Esta inestabilidad génica altera las vías de transducción de señales que regulan procesos tan importantes como supervivencia y proliferación celular, metabolismo

y expresión génica. Las funciones biológicas que caracterizan a la mayoría de células cancerosas y las rutas de señalización implicadas se detallan a continuación (**Figura 6**).

1) Señalización de proliferación sostenida.

Los tejidos sanos controlan cuidadosamente la producción y liberación de señales mitóticas como factores de crecimiento y hormonas que se unen a receptores de membrana con actividad tirosina quinasa. Estos factores promueven la entrada de las células en el ciclo celular para su división. De este modo, se asegura el equilibrio en el número de células y la arquitectura y función normal del tejido. Las células tumorales en cambio, pueden adquirir la capacidad de mantener la señalización proliferativa. Puede producir factores de crecimiento por sí mismas, o de sus respectivos receptores, como en el caso de HER2/neu, sobreexpresado en aproximadamente un 23% de carcinomas mamarios (Press et al. 2005). Esto resulta en una estimulación mitótica autocrina. Además pueden enviar señales que estimulen a células sanas del estroma circundante para que produzcan factores de crecimiento y los liberen (estimulación paracrina). También se conocen mutaciones somáticas activantes de determinados circuitos de señalización, como en la proteína B-RAF (mutada en el 40% de los melanomas humanos) que mantiene activa la ruta de MEK/MAPK (Davies and Samuels 2010) o en la subunidad catalítica de la proteína PI3K que hiperactiva la ruta PI3K/AKT (Jiang and Liu 2009). Otro mecanismo consiste en bloquear los sistemas de retroalimentación negativa que atenúan las señales proliferativas (Amit et al. 2007). Un ejemplo de este tipo de regulación es la oncoproteína Ras, ya que su efecto oncogénico no proviene de la hiperactivación de su señalización, sino que las mutaciones que afectan a los genes Ras comprometen su actividad GTPasa que actúa como mecanismo de *feedback* negativo intrínseco, que en condiciones normales asegura que la señal sea transitoria. Otro ejemplo es la fosfatasa PTEN, que inhibe la señalización de PI3K defosforilando su producto (PIP3). Mutaciones inactivantes en PTEN o la metilación de su promotor, provocan la pérdida de

función que desemboca en un aumento de la señalización por PI3K promoviendo la tumorigénesis, tal y como se demuestra en una amplia variedad de modelos experimentales de cáncer (Jiang and Liu 2009).

2) Evasión de las señales inhibitorias de la proliferación.

La activación de oncogenes no constituye la única vía hacia la malignidad. En la gran mayoría de los cánceres la transformación maligna es resultado de la combinación de la activación de oncogenes y la inactivación anormal de genes supresores de tumores. Estos últimos se dividen en: guardianes (*Gatekeepers*) como TP53, RB1 y APC. Regulan la división celular y la apoptosis. Controlan los puntos de control del ciclo celular e inducen a la muerte de la célula si ha sufrido un daño en el DNA irreparable. Por ejemplo, es muy frecuente encontrar mutado a TP53 en células cancerosas (Goh, Coffill, Lane 2011) y se han intentado diversas estrategias terapéuticas anticancerosas para reactivar la vía de TP53 (Brown et al. 2009). Los vigilantes (*Caretakers*) como BRCA1, BRCA2, MLH1 y MSH2. Previenen la aparición de mutaciones que se suceden en la replicación del DNA, son los genes de mantenimiento del genoma (Oliveira, Ross, Fletcher 2005). En este sentido genes como TP53 pertenecerían a las dos categorías. Recientemente se ha propuesto un tercer grupo, el de los *Landscapers*. Son genes que ayudan a crear el microambiente en el que crecen las células cancerosas. Un ejemplo de esta categoría es el gen PTEN (Stratakis 2003), aunque se cree que RB1 también podría funcionar como *Landscaper* (Macleod 2000). Las alteraciones en estos genes se manifiestan con carácter recesivo, es decir se necesita la alteración de ambos alelos del gen en cuestión para provocar una alteración fenotípica que comprometa la fisiología de la célula. Como una de las mutaciones puede estar presente en la línea germinal, esto explica que la mayoría de cánceres hereditarios se deban a mutaciones en genes supresores de tumores.

3) Evasión de la apoptosis.

La muerte celular programada es un proceso celular esencial para el desarrollo y el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos adultos. Su misión, es eliminar las células dañadas, infectadas o transformadas. Numerosos estudios han establecido que la muerte celular programada por apoptosis sirve como barrera natural contra el desarrollo del cáncer (Adams and Cory 2007; Lowe, Cepero, Evan 2004), por este motivo, la evasión de la apoptosis es un evento frecuente en células cancerosas. Para lograr escapar a este fenómeno las células tumorales poseen varios mecanismos entre los cuales están la sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 (Cory, Huang, Adams 2003), la inactivación de proteínas inductoras de la apoptosis como p53 (Shen and White 2001) y la activación constitutiva de las vías de supervivencia que mantienen bloqueada la apoptosis, como la ruta PI3K/AKT. La fosforilación de BAD por AKT promueve su disociación de BCL-XL y la subsiguiente interacción con 14-3-3, permitiendo la supervivencia celular (del Peso et al. 1997; Zha et al. 1996).

4) Potencial replicativo ilimitado.

Las células de los organismos pluricelulares en general y de los mamíferos en particular, poseen un programa de autonomía celular que limita su capacidad replicativa. Este proceso se encuentra regulado por la longitud de los telómeros o zonas terminales de los cromosomas. Los telómeros están compuestos por múltiples repeticiones de hexanucleótidos (TTAGGG) que protegen las terminaciones de los cromosomas frente a la degradación del DNA (Donate and Blasco 2011). Debido al proceso de replicación del DNA, las células normales van perdiendo parte de los telómeros tras cada ciclo celular. Cuando el acortamiento de los telómeros alcanza un límite, la célula entra en senescencia replicativa. La enzima encargada de añadir las repeticiones de hexanucleótidos en los telómeros es la telomerasa. La telomerasa se expresa en mayor medida en las células madre y durante las primeras fases de desarrollo embrionario. La actividad telomerasa

también está presente en las células madre de adultos, pero su actividad no es suficiente para prevenir el constante acortamiento de los telómeros tras cada división celular (Blasco 2005). Los telómeros se van acortando progresivamente, llegando a perder su capacidad de proteger las terminaciones de los cromosomas. El mantenimiento de los telómeros, por tanto, es un proceso crucial en cáncer. Las células cancerosas han desarrollado mecanismos, como la reactivación de la telomerasa, para evitar el acortamiento de estas secuencias de DNA y poder proliferar sin límites (Satyanarayana, Manns, Rudolph 2004).

5) Inducción de angiogénesis.

Igual que un tejido sano, los tumores requieren un sustento en forma de nutrientes y oxígeno, y un modo de evacuar los desechos metabólicos y el dióxido de carbono. Para suplir estas necesidades, los tumores activan procesos de angiogénesis para formar nuevos vasos sanguíneos (neovascularización). Existen factores inhibidores e inductores de angiogénesis, que mantienen el equilibrio. Sin embargo, durante la progresión tumoral la angiogénesis permanece activa. Uno de los principales inductores de angiogénesis es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Carmeliet 2005), cuya expresión está promovida por factores de crecimiento, hormonas, citoquinas y oncogenes (Ferrara 2010).

6) Invasión de tejidos y metástasis.

En la progresión tumoral las células cancerosas adquieren la capacidad de migrar, invadir los tejidos cercanos al tumor, alcanzar los vasos sanguíneos y/o linfáticos y colonizar tejidos distantes. Un evento importante en este proceso es la transición epitelio-mesénquima o EMT (Huber, Kraut, Beug 2005). Durante la EMT, las células epiteliales pierden la adhesión que existe entre ellas y adquieren la capacidad de migrar. Se conocen varios factores de transcripción, como Twist y Snail que participan en este proceso (Yang et al. 2004). Sin embargo, para que la migración y la invasión sean posibles, las células también deben adquirir la

capacidad de destruir barreras biológicas, como la membrana basal. Este propósito puede alcanzarse gracias a la acción de metaloproteasas (MMPs) que degradan proteínas de la matriz extracelular.

7) Evasión del ataque inmunológico.

Un proceso que todavía no está muy bien definido, es el papel que el sistema inmune juega en resistir o erradicar el inicio y progresión de neoplasias incipientes y micrometástasis. El papel de una monitorización inmunológica defectuosa de los tumores parecía haberse validado al observar un incremento de ciertos tipos de cáncer en individuos inmunodeprimidos. Sin embargo, la gran mayoría de estos cánceres son inducidos por virus, y parece que el papel del sistema inmune es eliminar las células infectadas reduciendo la carga viral en los individuos afectados. Datos clínicos epidemiológicos y modelos murinos han sugerido que el sistema inmune opera como una barrera importante para la formación y progresión del tumor, al menos en algunas formas de cáncer no inducido por virus. Los resultados indican que al menos en ciertos modelos experimentales el sistema inmune adaptativo e innato contribuyen significativamente a la vigilancia inmunológica y de este modo a la erradicación del tumor (Teng et al. 2008).

La hipótesis que actualmente se baraja es que las células cancerosas pueden evadir la destrucción inmunológica al deshabilitar los componentes del sistema inmune enviados para eliminarlas. Por ejemplo, las células tumorales pueden detener a las células NK (*natural killers*) secretando TGF- β u otros factores inmunosupresores (Yang, Pang, Moses 2010).

8) Reprogramación del metabolismo energético.

La proliferación celular crónica y descontrolada que representa la esencia de la enfermedad neoplásica no solo envuelve la desregulación de la proliferación celular sino también los correspondientes ajustes del metabolismo energético para

proveer de energía al crecimiento y división celulares. Bajo condiciones aeróbicas las células normales convierten la glucosa a piruvato por la vía de la glicólisis en el citosol y después a dióxido de carbono en la mitocondria. Bajo condiciones anaerobias la glicólisis es favorecida y relativamente poco piruvato se destina a la oxidación en la mitocondria. Incluso en presencia de oxígeno las células cancerosas pueden reprogramar su metabolismo de la glucosa y de este modo su producción de energía, utilizando preferentemente la vía de la glicólisis (glicólisis aeróbica). Esto puede parecer contradictorio, ya que la producción de ATP vía mitocondrial es 18 veces más eficiente que la producida por glicólisis. Sin embargo, se ha visto que las células tumorales lo compensan en parte aumentando los transportadores de glucosa, principalmente GLUT1, el cual aumenta sustancialmente el transporte de glucosa hacia el citoplasma (Jones and Thompson 2009). De hecho, en muchos tipos de tumores humanos se ha visto un marcado incremento del consumo y utilización de glucosa. El suministro energético vía glicólisis se ha visto asociado con la activación de oncogenes como RAS y MYC y con mutaciones en genes supresores de tumores como TP53 (Jones and Thompson 2009). Las enzimas IDH1 e IDH2 son enzimas clave en el metabolismo energético de las células, actuando en el metabolismo de los carbohidratos durante el ciclo de Krebs. De hecho, hay evidencias significativas que demuestran que estas deshidrogenasas están mutadas en numerosos tipos de cáncer de cerebro (Zhang et al. 2013) y en otros tipos de cáncer (Yang et al. 2012).

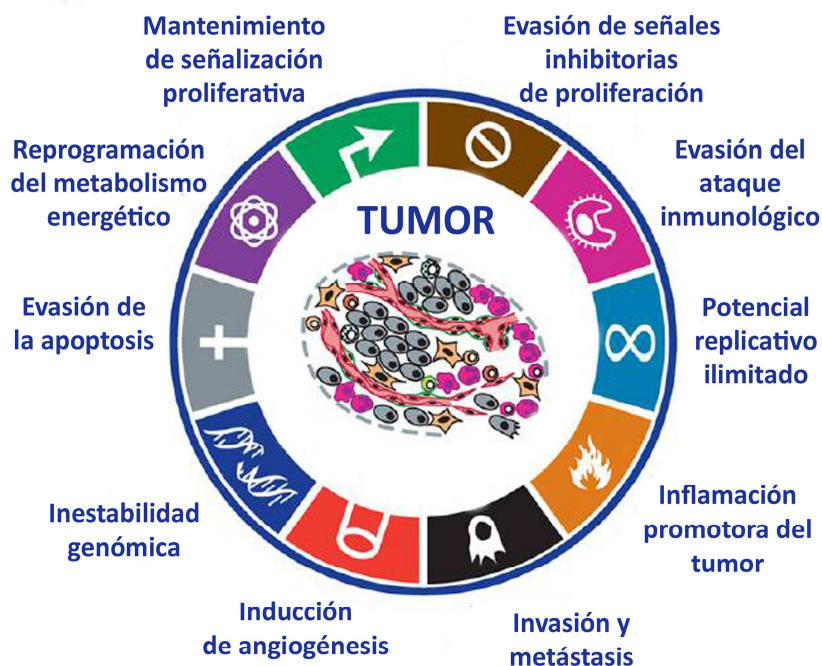


Figura 6. Funciones biológicas que caracterizan a los tumores. El inicio y progresión del cáncer depende de una serie de capacidades que las células tumorales van adquiriendo y que les permiten proliferar de forma descontrolada, evadir los mecanismos apoptóticos y migrar hacia otros tejidos (Hanahan and Weinberg 2011).

2.3 Modelos animales de estudio en cáncer.

Como hemos visto, el desarrollo de un tumor implica la desregulación de una gran variedad de rutas de señalización que también operan en una célula sana. Por este motivo, ha sido de vital importancia durante las últimas décadas el uso de modelos murinos modificados genéticamente para analizar los mecanismos moleculares que desencadenan y promueven la progresión tumoral. Se han utilizado varias aproximaciones para el estudio del cáncer en ratones modificados genéticamente (Cheon and Orsulic 2011). Una primera opción consiste en generar ratones transgénicos que sobreexpresan oncogenes mimetizando las

amplificaciones génicas y sobreexpresiones que ocurren en los tumores humanos. La sobreexpresión se puede dirigir a un tejido o población celular específica mediante el uso de un promotor determinado como por ejemplo MMTV, WAP o BLG para mama; CCSP para pulmón; K14 para piel; PB para próstata; ALFP para hígado. En ocasiones también se ha utilizado promotores constitutivos como CMV cuya expresión es ubicua en todos los tejidos. Mediante esta estrategia se ha estudiado en profundidad el papel en la carcinogénesis de oncogenes como Ras (Sinn et al. 1987), Myc (Adams et al. 1985), HER2/Neu (Guy et al. 1992), AIB1 (Torres-Arzayus et al. 2004), entre otros.

Otra estrategia utilizada para el estudio del cáncer con modelos murinos, es generar ratones con deleciones completas, parciales o mutaciones inactivantes de genes supresores de tumores. Son los denominados ratones *knockout* (KO), en los que la expresión de un gen determinado queda suprimida en todo el organismo. Mediante esta metodología se ha estudiado el papel de genes supresores de tumores como BRCA1/BRCA2 (Ludwig et al. 1997), TP53 (Donehower et al. 1992), RB (Jacks et al. 1992), PTEN (Gingrich and Greenberg 1996), APC (Moser, Pitot, Dove 1990), entre otros.

Existe una tercera estrategia para el estudio de la pérdida de función génica. Son los sistemas de inactivación génica condicionales e inducibles. Los ratones *knockouts* condicionales son de gran utilidad para el estudio de genes que causan letalidad embrionaria en *knockouts* convencionales. Por ejemplo los ratones *knockout* de BRCA1 mueren durante el desarrollo embrionario, sin embargo, los ratones BRCA1 condicionales que expresan *Cre* en el epitelio de la glándula mamaria desarrollan tumores mamarios (Xu et al. 1999). Estos modelos de animales transgénicos permiten inducir mutaciones somáticas específicas de tejido e incluso de tipo celular y de un modo controlado en el tiempo. Los modelos más comúnmente usados son: el sistema Cre-loxP, el sistema FLP-FRT (*flippase-flippase recognition target*), el sistema Cre-loxP inducible y el sistema tetraciclina inducible (Tet-On/Tet-Off). Los modelos murinos más recientes combinan varias tecnologías para una imitación más precisa del inicio y progresión tumoral.

El sistema de inactivación génica condicional más común es el sistema Cre-loxP. La ventaja de este sistema es que la función génica puede ser estudiada en un tejido específico o tipo celular y en un momento determinado, permitiendo un estudio más preciso de los eventos mutacionales esporádicos en un conjunto de células. Cre es una recombinasa que procede del fago P1 y que no está presente de forma endógena en animales. Cre tiene la capacidad de eliminar fragmentos de DNA flanqueados por sitios lox-P (locus de X-sobre P1), secuencias específicas de DNA de 34 pares de bases. La escisión temporal y espacial de la región que se quiere eliminar, se consigue al expresar la enzima Cre bajo el control de un promotor específico de tejido o célula. De este modo, el gen flanqueado por secuencias loxP sólo es deletado donde se expresa Cre (**Figura 7**).

La expresión de la recombinasa puede conseguirse mediante el uso de ratones transgénicos que expresan Cre en un tejido específico o administrando lentivirus o adenovirus que expresan Cre. La mayor desventaja del sistema condicional es su irreversibilidad, una vez que la delección ha ocurrido en la célula todos sus descendientes serán portadores del alelo recombinado incluso aunque el promotor que dirige la expresión de Cre ya no este activo en los descendientes. La expresión de Cre fuera del tejido de interés o en un estadio del desarrollo muy temprano puede ser problemática porque esto causaría fenotipos inesperados o letalidad embrionaria. La disponibilidad limitada de líneas de ratones Cre es otro inconveniente para el uso de este sistema, aunque este hecho puede solventarse con el uso de lentivirus o adenovirus Cre. La expresión de Cre mediada por virus permite el control de la cantidad, el tiempo y la frecuencia de la inyección vírica para una recombinación óptima mediada por Cre. Sin embargo, esta estrategia también presenta varios problemas. Dependiendo del tipo de tejido, la inyección de Cre puede estar restringida o requerir cirugía. Otro problema es que los virus Cre pueden también infectar a tejidos vecinos complicando el estudio del tumor. Adicionalmente, un virus podría causar una respuesta inmune en el huésped dependiendo de la dosis y frecuencia de la infección.

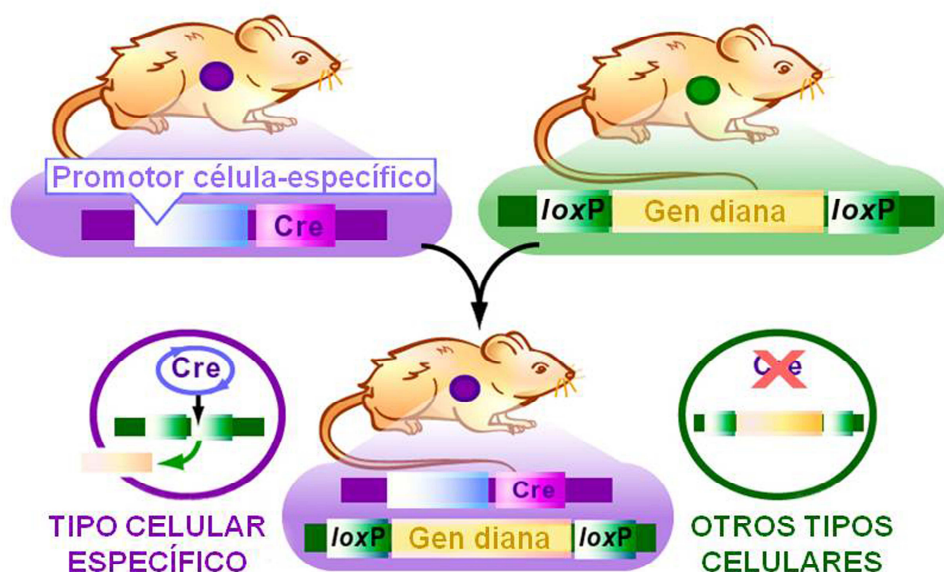


Figura 7. Cruce entre ratones Cre y loxP. Ratones que expresan la proteína Cre en un tipo celular específico, son cruzados con ratones que contienen un gen diana rodeado por sitios loxP. Cuando se obtiene un ratón portador de los dos caracteres, se producirá la eliminación del gen diana en las células que expresen Cre (Pechisker 2004).

Los sistemas de inactivación génica inducibles permiten un control temporal de los cambios genéticos. Actualmente existen dos tipos de sistemas ampliamente usados: el sistema inducible por tamoxifeno y el sistema inducible Tet-On/Tet-Off. En el sistema inducible por tamoxifeno, el dominio de unión a ligando de un receptor de estrógenos mutado se fusiona a la recombinasa Cre (Cre-ER^T). La proteína fusionada puede ser activada por la administración de tamoxifeno o inactivada por su retirada.

El sistema inducible Tet-On/Tet-Off es usado muy frecuentemente para activar/desactivar la expresión génica. La especificidad tisular se consigue a través del uso de promotores específicos de tejido. Tetraciclina o doxiciclina (una versión menos tóxica) pueden ser inyectadas en el ratón o simplemente añadidas en el agua de bebida. Este sistema es muy útil en el estudio de la expresión mantenida

de algunos oncogenes durante la progresión tumoral. Por ejemplo, se ha observado que la inactivación del gen mutante Ras mediante el uso de doxiciclina produce una regresión histológica de melanoma y cáncer de pulmón, lo cual demuestra el papel de Ras en el mantenimiento tumoral (Fisher et al. 2001).

2.4 Cáncer de mama.

Como se ha comentado en el punto 1, las glándulas mamarias están sometidas a una permanente evolución. Bajo el influjo de las hormonas ováricas (estrógenos y progesterona), las mamas crecen durante la pubertad y se ven influenciadas en la edad reproductiva por los ciclos menstruales, por el embarazo y la lactancia. En la menopausia, los niveles hormonales descienden y gran parte de la glándula mamaria se atrofia y es sustituida por grasa. Este continuo remodelado requiere de un control muy preciso de los procesos de proliferación, diferenciación y muerte celular que ocurren en las células epiteliales que forman la mama. Los errores que se producen en este proceso tan dinámico, pueden dar lugar a procesos patológicos como el cáncer. Las células epiteliales transformadas, pierden la capacidad de formar parte de alveolos y ductos organizados, pierden su funcionalidad y crecen descontroladamente ocupando el lumen de lóbulos y lobulillos (carcinoma *in situ*). En ocasiones, las células transformadas pierden los contactos y adhesiones específicas con otras células, comienzan entonces procesos de migración e invasión del estroma (carcinoma invasivo) pudiendo alcanzar los vasos sanguíneos y colonizar otros tejidos (metástasis). El cáncer de mama tiene el potencial de metastatizar a otros tejidos, principalmente a ganglios linfáticos, pulmón y hueso. Tradicionalmente el cáncer de mama se ha clasificado por la localización donde se inicia y por su invasividad: carcinoma ductal invasivo, carcinoma lobulillar *in situ*, carcinoma lobulillar invasivo, carcinoma inflamatorio, enfermedad de Paget, y los menos frecuentes carcinoma medular, coloide y tubular. Posteriormente, también se dividió según el contenido de receptores que mostraban los tumores: receptor hormonal positivo (ER y/o PR), receptor HER2 positivo y triple negativo. Esto contribuyó al tratamiento diferencial

que se daba a las pacientes. Con la llegada de los arrays de expresión génica, los tumores de mama han pasado a clasificarse por su identidad molecular. En un principio la clasificación de Perou (Perou et al. 2000) basada en la identificación de una lista de genes y la posterior agrupación jerárquica de éstos, identificó 3 subtipos de cáncer mamario: tipo luminal ER+, tipo basal y HER2+. Este procedimiento agrupaba tumores que presentaban un comportamiento clínico y una sensibilidad a agentes terapéuticos similares. Sin embargo, se encontró variabilidad de respuesta terapéutica entre los tumores de un mismo grupo. Posteriormente se propuso clasificar a los subtipos de cáncer de mama obtenidos por perfiles de expresión génica como: luminal A (ER+ y/o PR+, HER2-), luminal B (ER+ y/o PR+, HER2+), basal (triple negativo) y HER2+ (ER- y PR-) (Schnitt 2010). Recientemente, los tumores triple negativos han sido clasificados a su vez en 6 subtipos moleculares: dos subtipos basales BL1 y BL2 caracterizados por genes de control del ciclo celular y de respuesta al daño en el DNA que preferentemente responden a cisplatino; subtipo AR, enriquecido en genes de la ruta de señalización del receptor de andrógenos; un tipo inmunomodulador (IM) definido por marcadores celulares de inmunidad y genes de señalización; subtipo mesenquimal (M); subtipo mesenquimal tipo célula madre (MSL), los dos últimos ricos en genes relacionados con EMT, diferenciación y rutas de factores de crecimiento (Lehmann et al. 2011).

El cáncer de mama es el tumor más frecuente en las mujeres occidentales. En España se diagnostican alrededor de 25.000 nuevos casos cada año, siendo la primera causa de muerte por cáncer en mujeres. La supervivencia ha mejorado notablemente en los últimos 20 años (anualmente se incrementa la supervivencia por este tumor un 1,4%). Cada año disponemos de mayor información para diagnosticar precozmente y tratar el cáncer de mama, lo que ha permitido que la supervivencia global a los 5 años del diagnóstico de este tumor sea del 82,8% en nuestro país, por encima de la media europea y similar a los países con las mejores cifras de supervivencia (Ferlay et al. 2013). Sin embargo, paradójicamente la tasa de incidencia no deja de aumentar. Este hecho se cree que es debido a que el modo de vida actual incrementa algunos de los factores de

riesgo relacionados con este tipo de cáncer, como son la dieta, los cambios hormonales y las nuevas pautas reproductivas. Por supuesto, poseer un riesgo mayor para el cáncer de mama no implica la certeza de que se vaya a padecer la enfermedad, sólo indica cierta predisposición. Los factores de riesgo para desarrollar cáncer de mama son los siguientes:

- Antecedentes familiares (factores genéticos). Mutaciones en genes supresores como BRCA1 y BRCA2 confieren alto riesgo a desarrollar cáncer. Se cree que hasta un 10% de los casos de cáncer de mama se deben a una predisposición genética (Colditz, Rosner, Speizer 1996).
- Densidad mamográfica (Boyd et al. 2009).
- Edad. Es un factor muy importante, el riesgo aumenta a medida que envejecemos, probablemente debido a mayor tiempo de exposición a estrógenos, entre otras causas. Más del 70% de los diagnósticos de producen en mujeres mayores de 50 años.
- Sexo. Menos de un 1% de los cánceres de mama se producen en varones. Este tipo de cáncer se da sobre todo en mujeres porque las células de la mama están más expuestas a efectos promotores del crecimiento por parte de hormonas como estrógenos y progesterona.
- Menarquía precoz o menopausia tardía (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer 2012).
- Nuliparidad.
- Edad del primer embarazo. Actualmente la tendencia en las mujeres es a tener menos hijos y a una edad más avanzada. Se sabe que un primer embarazo a una edad de entre 20-25 años es un factor reductor del riesgo a padecer cáncer de mama (Kampert, Whittemore, Paffenbarger 1988). Sin embargo diferentes estudios han detectado un elevado riesgo de cáncer en los años que siguen a un embarazo (Lambe et al. 1994). Este riesgo se debe a que tras el embarazo, las rutas relacionadas con la muerte celular programada y el remodelado del tejido que ocurre durante la involución de la mama, generan un microambiente proinflamatorio ideal para favorecer

eventos oncogénicos. Este riesgo asociado al embarazo aumenta si la edad de la madre en el primer parto es superior a 35 años (Zaragoza et al. 2015).

- Obesidad en mujeres postmenopáusicas (Morimoto et al. 2002).
- Dieta pobre en fibras y rica en grasas animales; tabaquismo e ingesta de alcohol; sedentarismo (Hamajima et al. 2002).

Conocer en detalle el mecanismo por el cual se inicia y progresa un tumor es de vital importancia para poder conseguir tratamientos más eficaces. Es aquí donde cobra importancia el estudio del oncogén AIB1, ya que este coactivador de receptores nucleares y de otros factores de transcripción, está implicado en numerosas funciones fisiológicas en el tejido sano y en el tejido tumoral, y a través de él se relacionan varias rutas de señalización, como se detallará a continuación.

3. AIB1

3.1 La familia de coactivadores transcripcionales p160.

Los receptores nucleares, como los receptores de hormona tiroidea, los receptores de retinoides y los receptores esteroideos, comprenden una gran familia de factores de transcripción implicados en numerosos aspectos de la fisiología humana, tales como la reproducción, el desarrollo y el metabolismo. Las actividades de la mayoría de los receptores nucleares están reguladas por pequeñas moléculas lipofílicas, que incluyen hormonas esteroideas y tiroideas, ácidos biliares, ácidos grasos, ciertas vitaminas y prostaglandinas. Los receptores nucleares comparten una organización estructural común con tres dominios funcionales principales: dominio de unión a DNA (DBD) en la región central, dominio de activación funcional 1 (AF-1) en el extremo amino-terminal y dominio de unión a ligando (LBD) que contiene el dominio de activación funcional 2 (AF-2) en la región carboxi-terminal (Kumar and Thompson 1999).

Para regular la expresión génica los receptores nucleares cooperan con una serie de moléculas reguladoras. Dependiendo del efecto activador o supresor de estos correguladores, se habla de coactivadores o correpresores respectivamente. El paso inicial en la activación de la transcripción es la liberación de los receptores nucleares de sus correpresores. En general, después de la unión del ligando, el receptor nuclear sufre un cambio de conformación que le permite disociarse de estos inhibidores y reclutar varios coactivadores y moléculas reguladoras, formándose el complejo coactivador. A continuación, este complejo provoca modificaciones químicas y estructurales en la cromatina y comunica con la maquinaria de la transcripción basal para activar, finalmente, la expresión de los genes diana. Los coactivadores de la transcripción también son capaces de integrar otras señales celulares como fosforilaciones, o de reclutar a otros coactivadores (**Figura 8**) (Kishimoto et al. 2006).

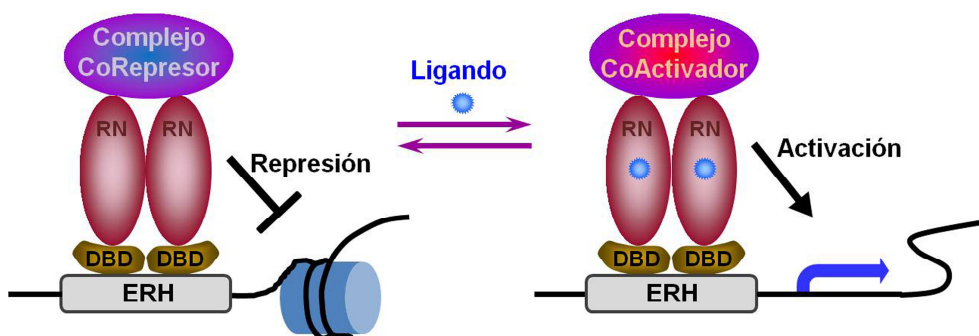


Figura 8. Coactivación de los receptores nucleares. Cuando el ligando se une a su respectivo receptor, se desprende el complejo correpresor y moléculas coactivadoras se unen al receptor nuclear, facilitando la transcripción de genes diana.

Entre todos los coactivadores de receptores nucleares, los más estudiados son la familia de coactivadores de receptores esteroideos (SRC), también llamada p160 por el tamaño aproximado de las proteínas de esta familia expresado en KDa, las cuales comparten un 40% de homología. En este grupo se han incluido hasta la fecha 3 miembros:

- SRC-1/ NCoA1 (coactivador de receptores nucleares 1) se clonó por primera vez gracias su capacidad de interaccionar con los receptores ER, PR, TR (Onate et al. 1995). Se encuentra en el cromosoma humano 2p23 y se expresa en multitud de tejidos (Carapeti et al. 1998). Su actividad se ha relacionado fundamentalmente con la sensibilidad a hormonas esteroideas y tiroideas (Weiss et al. 1999). También se ha relacionado con el desarrollo y función del cerebelo (Iannaccone et al. 2002), asimismo está implicado en el balance metabólico entre tejido adiposo blanco y pardo (Picard et al. 2002). Por otra parte, SRC-1 promueve la metástasis en tumores de mama mediante la coactivación de PEA3 en la expresión de Twist (Qin et al. 2009). Sin embargo, aunque SRC-1 facilita la formación de metástasis, no tiene ningún efecto sobre la formación o iniciación del tumor primario (Wang et al. 2009) y su papel en carcinogénesis de próstata en ratones no es esencial debido a una posible compensación por parte de SRC-3 (Tien, Zhou, Xu 2009).
- SRC-2/ NCoA2/ TIF-2 (factor intermediario transcripcional 2)/ GRIP1 (proteína de interacción con el receptor de glucocorticoides 1) se clonó por su capacidad de interaccionar con ER y GR. Se encuentra en el cromosoma humano 8q21 (Kalkhoven et al. 1998). Su función también se ha relacionado con el metabolismo en tejido adiposo blanco y pardo (Picard et al. 2002) y con el comportamiento reproductivo (Apostolakis et al. 2002).
- SRC-3/ NCoA3/ AIB1 (amplificado en cáncer de mama 1)/ RAC3 (proteína de interacción con el receptor de ácido retinoico 3)/ p/CIP (proteína de interacción con p300/CBP)/ ACTR (molécula activada acetiltransferasa del receptor de hormona tiroidea 1)/ TRAM1 (molécula activadora del receptor de hormonas tiroideas 1) se identificó inicialmente como un gen amplificado en la región cromosómica humana 20q12 en cánceres de mama y ovario (Anzick et al. 1997). Actualmente se sabe que AIB1 también está sobreexpresado en otros tipos de cánceres no ginecológicos. Es el único de los tres miembros de la familia de coactivadores SRC que ha sido relacionado con la iniciación tumoral (Yan, Tsai, Tsai 2006), lo que lo convierte en el más relevante de los

tres a nivel clínico. Por otro lado, las funciones biológicas en las que participa AIB1 también le diferencian de SRC-1 y SRC-2.

Los miembros de la familia de coactivadores SRC son capaces de interactuar no solo con receptores nucleares, sino con otros factores de transcripción como NF- κ B (Wu et al. 2002), AP-1 (Yan et al. 2006), transductores y activadores de la señal (STATs) (Giraud et al. 2002), factores nucleares de hepatocitos (HNFs) (Iordanidou et al. 2005), factores de transcripción dependientes de MAP quinasas (Ets) (Myers et al. 2005), p53 (Lee et al. 1999) y E2F1 (Louie et al. 2004). Estas interacciones son posibles gracias a los dominios que poseen las proteínas codificadas por los genes SRC. En primer lugar presentan un dominio bHLH/PAS en la región N-terminal que podría permitir la unión a proteínas que también contengan este dominio. Después le siguen un dominio rico en serinas y treoninas, en donde se encuentran multitud de aminoácidos susceptibles de ser fosforilados. Las modificaciones postraduccionales juegan un papel fundamental en la modulación de la actividad de AIB1 (Wu et al. 2004). También poseen un dominio de unión a receptores nucleares (RID) en el que existen múltiples motivos LXXLL (donde L, leucina y X, cualquier otro aminoácido) responsables de la unión del receptor unido a ligando. En la región carboxi-terminal se encuentra el dominio AD-1, que también contiene motivos LXXLL, responsable del reclutamiento de histona acetiltransferasas como CBP y p/CAF, y el dominio AD-2 que es el encargado de reclutar histona metiltransferasas como CARM-1 y PRMT-1. Estas enzimas, remodelarán la cromatina para facilitar el inicio de la transcripción. Tanto SRC-1 como AIB1, poseen actividad histona acetiltransferasa (HAT) intrínseca, aunque ésta es mucho más débil que la que presentan histona acetiltransferasas propiamente dichas como CBP y p/CAF. AIB1 además contiene una cola de poliglutaminas (poli Q) (**Figura 9**).

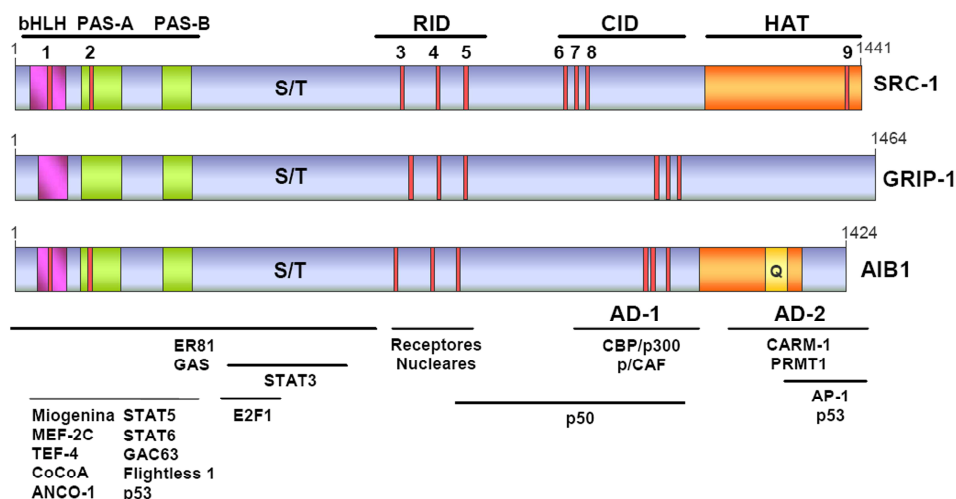


Figura 9. Dominios estructurales de las proteínas SRC. La región aminoterminal contiene el dominio bHLH/PAS que corresponde con el dominio más conservado; S/T, región rica en serinas y treoninas; 1-9, motivos LXXLL; RID, dominio de interacción con receptores nucleares; CID, dominio de interacción a CBP/p300; HAT, actividad histona acetiltransferasa intrínseca; Q, cadena de poliglutaminas; AD-1, dominio de activación transcripcional 1; AD-2, dominio de activación transcripcional 2. En la parte inferior de la figura se representan las zonas de interacción con diversas proteínas reguladoras y factores de transcripción. Adaptada de (Ferrero and Font de Mora 2012).

Las proteínas de la familia p160 desempeñan más funciones en la regulación celular de las que en principio se pensaban. De esta manera, cambios en los niveles y actividades de estos coactivadores podrían alterar en gran medida los niveles de expresión de muchos genes y, en consecuencia, afectar numerosos procesos celulares.

3.2 Funciones fisiológicas de AIB1.

La mayor parte del conocimiento que hoy se tiene sobre el papel de AIB1 en la fisiología viene directamente del estudio de modelos animales. Mediante técnicas de inmunohistoquímica se ha demostrado que AIB1 se expresa en

ovocitos, musculatura lisa del oviducto, epitelio de la vagina, glándula mamaria, músculo liso de los vasos sanguíneos y del intestino, hepatocitos, hipocampo, bulbo olfatorio y en la capa granular interna del cerebelo de ratones (Xu et al. 2000). Como se puede apreciar, algunos de estos tejidos están relacionados con respuesta a hormonas, lo que sugiere que AIB1 tiene una función importante en la respuesta endocrina. Mediante el uso de modelos animales deficientes en AIB1 se ha comprobado que este coactivador está implicado en diversas funciones biológicas.

AIB1 durante el desarrollo

Los ratones *knockout* para AIB1 ($SRC-3^{-/-}$) muestran un retraso en el crecimiento y los adultos tienen un tamaño corporal reducido. En las hembras la función reproductora está disminuida y el desarrollo de la glándula mamaria retrasado (Wang et al. 2000; Xu et al. 2000). Estos efectos son reproducibles en ratones *knockout* condicionales de $SRC-3$ ($SRC-3^{del/del}$), generados tras el cruce de ratones con los exones 11 y 12 (correspondientes al dominio RID) de $SRC-3$ flanqueados por secuencias loxP ($SRC-3^{loxP/loxP}$) con ratones transgénicos de Cre (*Ella-Cre*) (Liu et al. 2008b).

A diferencia de los ratones $SRC-3^{-/-}$, los ratones $SRC1^{-/-}$ y $TIF2^{-/-}$ exhiben un crecimiento normal, indicando funciones específicas para los diferentes coactivadores p160.

Papel de AIB1 en la función reproductora

En machos $SRC-3^{-/-}$ la función reproductora se halla ligeramente reducida. Sin embargo, las hembras deficientes en AIB1 muestran un desarrollo anormal en su sistema reproductor. En primer lugar, la maduración sexual está retrasada, debido probablemente a los bajos niveles de estrógenos en las hembras de todas las edades. Por otro lado, la ovulación está disminuida, el ciclo estral es más largo,

con lo que existe una menor frecuencia de embarazos y las camadas son más pequeñas (Wang et al. 2000; Xu et al. 2000).

Función de AIB1 en el metabolismo

Los ratones *SRC-3*^{-/-} presentan un mayor gasto energético debido a un aumento de la actividad mitocondrial en el tejido adiposo pardo y músculo esquelético, además de tener un peso corporal disminuido (Coste et al. 2008). Esto es debido a que AIB1 regula la expresión de la histona acetiltransferasa GCN5 que acetila e inhibe la actividad de PGC-1 α (coactivador de PPAR γ 1), el cual es importante en la termogénesis adaptativa y en el metabolismo de la glucosa. La ingesta calórica induce la expresión de AIB1, lo que resulta en una inhibición de PGC-1 α y del gasto energético. Por el contrario, la restricción calórica reduce los niveles de AIB1, aumentando la actividad de PGC-1 α y, por tanto, el gasto energético (Coste et al., 2008). Además, AIB1 es un regulador crítico en el desarrollo del tejido adiposo blanco (Louet et al. 2006). En ausencia de AIB1, la diferenciación de los adipocitos está impedida debido a la reducción de la actividad de los factores de transcripción C/EBP α y δ y, en consecuencia, a la disminución de la expresión de PPAR γ 2, factor de transcripción esencial en la adipogénesis.

Por otro lado, los ratones con mutaciones en cuatro de los sitios de fosforilación conservados de AIB1, muestran un peso corporal incrementado, mayor adiposidad y reducida sensibilidad periférica a insulina (York et al. 2010).

AIB1 y su función en la proliferación tiroidea

Mutaciones en el receptor β de la hormona tiroidea (TR β) producen resistencia a la hormona tiroidea (RTH) y limitación en el crecimiento. El modelo murino TR β PV se ha usado para estudiar el proceso de RTH, ya que los ratones de esta línea son portadores de una mutación encontrada previamente en humanos. La eliminación de AIB1 en estos ratones restauró parcialmente la

disfunción del eje pituitario-tiroideo, reduciendo el crecimiento tanto de la glándula pituitaria como de la tiroidea. Sin embargo, la ganancia de peso en los ratones empeoró. Este estudio identifica a AIB1 como modulador de las manifestaciones fenotípicas producidas por la RTH. Su acción resultó dependiente de tejido, y la doble función observada en el eje pituitario-tiroideo y en el crecimiento corporal puede ser explicada por un lado por su papel como corregulador de receptores y por otro, por su activación de la ruta IGF-I/PI3K/AKT/mTOR (Ying et al. 2005).

Función de AIB1 en la proliferación de cardiomiocitos

El uso de ratones con delección específica en cardiomiocitos de *SRC-1* y *SRC-3* (modelo *knockout* condicional) ha permitido examinar los patrones de expresión espaciales y temporales de *SRC-1* y *SRC-3* en el desarrollo del corazón y sus funciones en la miocardiopatía no compactada (NCC), una enfermedad congénita del corazón que causa disfunción ventricular y alta tasa de mortalidad en niños. *SRC-1* y *SRC-3* son necesarios para la proliferación y diferenciación de cardiomiocitos en los estadios de desarrollo más tempranos, y su disfunción causa anomalías similares a la NCC en los corazones de ratones recién nacidos y adultos (Chen et al. 2015).

Función de AIB1 en el proceso inflamatorio

En macrófagos, AIB1 tiene una nueva función citoplásmica por la cual activa a los silenciadores de la traducción TIA-1 y TIAR, inhibiendo de este modo la traducción de citoquinas con la posterior inhibición de la traducción de citoquinas proinflamatorias. Este efecto fue inicialmente observado en los macrófagos de ratones *SRC-3*^{-/-}. Estas células producían de manera significativa una mayor cantidad de IL-6, IL-1 β y TNF- α en respuesta a endotoxemia, aún cuando los niveles de sus RNA mensajeros (mRNA) permanecían inalterados. Este resultado indica que AIB1 tiene una función protectora frente al choque

séptico desencadenado por una respuesta inflamatoria aguda (Li et al. 2012; Yu et al. 2007).

Función de AIB1 en la hematopoyesis

En ratones deficientes en AIB1 (*SRC-3*^{-/-}) se ha visto que la hematopoyesis está afectada. La ausencia de AIB1 provoca un descenso de las plaquetas y un aumento en el número de linfocitos, de manera que con la edad se puede incluso llegar al desarrollo de linfomas de células B (Coste et al. 2006). Por tanto, AIB1 tiene un papel antiproliferativo en el sistema linfoide.

Papel de AIB1 en la pluripotencialidad

AIB1 tiene un papel crucial en activar la transcripción de células madre embrionarias (ESC), al facilitar localmente un estado desplegado de la cromatina y servir de proteína de base sobre la que reclutar a la maquinaria de transcripción basal. AIB1 es un miembro clave en los circuitos transcripcionales que regulan la pluripotencialidad, convirtiéndose por tanto en un coactivador importante no solo en células somáticas y tumorales, sino también en el contexto de los estadios iniciales del desarrollo (Percharde and Azuara 2013).

Función de AIB1 en la vasoprotección dependiente de estrógenos

AIB1 también se expresa en el músculo liso de los vasos sanguíneos y en las células endoteliales. Se ha visto que este coactivador puede facilitar los efectos vasoprotectores mediados por ER a través de la inhibición de la formación de la neointima tras el daño vascular (Percharde and Azuara 2013).

Función de AIB1 en la angiogénesis

Ya que parte de esta tesis se centra en esta función de AIB1, vamos a detallar en primer lugar en qué consiste el proceso de angiogénesis y con qué genes está relacionado.

La angiogénesis es el proceso fisiológico que consiste en la formación de vasos sanguíneos nuevos a partir de los ya existentes mediante ramificación. Es un fenómeno necesario durante el desarrollo embrionario y el crecimiento del organismo en la infancia. Durante la edad adulta, el proceso de angiogénesis se detiene con dos excepciones, la cicatrización de heridas y la menstruación. Sin embargo también es un proceso fundamental en la progresión tumoral. El mediador clave en la angiogénesis es VEGF (VEGF-A), que pertenece a la familia de ligandos VEGF. En esta familia se incluyen: VEGF-A (el más relevante en angiogénesis), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-E y PlGF (factor de crecimiento placentario). Las funciones fisiológicas en las que participa VEGF se resumen en la **Tabla 1**:

Proceso	Papel del VEGF
Embriogénesis y desarrollo postnatal temprano	Esencial para la formación de vasos sanguíneos
	La supresión de un único gen del VEGF es letal
	Esencial para el desarrollo postnatal temprano, especialmente para la función renal
Crecimiento esquelético	Estimula la invasión de vasos sanguíneos necesaria para el crecimiento de huesos trabeculares
Maduración del cuerpo lúteo y angiogénesis uterina	Estimula la maduración del cuerpo lúteo que, a su vez, libera progesterona. Tanto la progesterona como el VEGF son necesarios para la angiogénesis uterina
Curación de heridas	Involucrado en la producción de nuevos vasos en el punto de la lesión

Tabla 1. Descripción de los procesos fisiológicos en los que participa VEGF (Ferrara, Gerber, LeCouter 2003).

La expresión de VEGF está regulada por varios factores que incluyen la hipoxia, el pH, factores de crecimiento, la transformación celular, hormonas, citoquinas y oncogenes (Ferrara 2010). Cuando se requiere activar el proceso de angiogénesis en un tejido, se libera este factor de crecimiento que puede unirse a varios receptores con actividad tirosina quinasa en las células endoteliales: VEGFR1, VEGFR2 y neuropilina-1. Los efectos biológicos del VEGF en angiogénesis son ejercidos principalmente por medio de la unión al receptor 2, el cual tiene la mayor actividad tirosina quinasa. Tras la unión al ligando, el VEGFR2 dimeriza y se inicia una cascada de transducción de señales intracelulares que posibilitan la proliferación, supervivencia y migración de las células endoteliales. La expresión de VEGFR2 está estimulada por el propio VEGF (**Figura 10**).

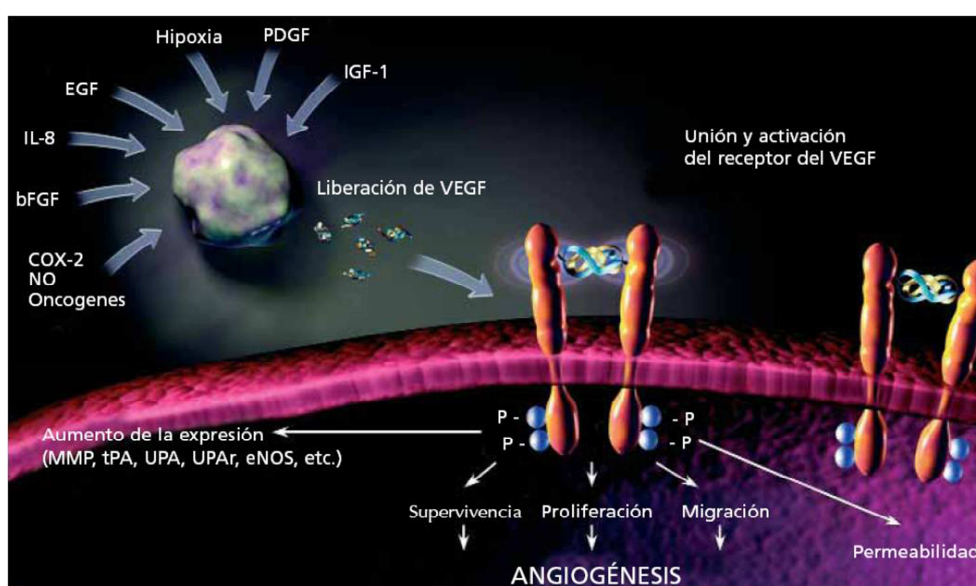


Figura 10. Factores que estimulan la producción de VEGF. La unión de VEGF a sus receptores inicia la cascada de señalización que da lugar a la formación de nuevos vasos sanguíneos. Imagen tomada de www.anti-vegf.com (2008).

La angiogénesis también es un proceso muy importante en patogénesis (**Tabla 2**). La enfermedad en la que mejor se ha estudiado y comprendido el VEGF es sin duda el cáncer, donde se sabe que el VEGF desempeña un papel decisivo en el desarrollo tumoral. Cuando el tumor supera los 2 mm de diámetro, ya no recibe suficientes nutrientes por simple difusión y necesita nuevos vasos sanguíneos. La sobreexpresión del VEGF por las células tumorales estimula la angiogénesis que permite que el tumor se disemine escapando a los mecanismos de control normales del organismo.

Trastorno	Papel del VEGF
Cáncer	Estimula la angiogénesis excesiva
	Permite que el tumor crezca de modo exponencial
	La vascularización facilita una ruta para que las células tumorales lleguen a puntos distales y formen metástasis
Retinopatías	Estimula la neovascularización intraocular provocando ceguera
Psoriasis	Estimula un aumento de la permeabilidad vascular y de la angiogénesis
Edema cerebral	Producción de VEGF probablemente estimulada por la isquemia
	Produce aumento de la permeabilidad vascular
Endometriosis	Los niveles elevados de VEGF en el líquido peritoneal sugieren que el VEGF está involucrado en la angiogénesis anormal relacionada con la endometriosis

Tabla 2. Descripción de las patologías en las que está involucrado VEGF (Ferrara, Gerber, LeCouter 2003).

En la glándula mamaria se ha visto que existe una regulación de VEGF y sus receptores en roedores durante pubertad, embarazo, lactancia e involución. Esto es coherente con el hecho de que la glándula mamaria es un órgano que sufre constantes procesos de crecimiento e involución en el desarrollo postnatal (Pepper et al. 2000). En lo referente a procesos patológicos en la glándula mamaria, se ha descrito que VEGF está sobreexpresado en cáncer de mama y es crítico para los primeros estadios de la enfermedad (Yoshiji et al. 1996). VEGF contribuye al crecimiento tumoral por dos vías: la paracrina, a través de la cual el VEGF producido por las células cancerosas actúa en las células endoteliales

incrementando la vascularización, y la autocrina, por la que las células cancerosas secretan VEGF que contribuye a su propia proliferación y supervivencia. Este mecanismo de señalización autocrino ha sido observado en estudios con modelos animales que sobreexpresan VEGF (Schoeffner et al. 2005) y en líneas celulares de cáncer de mama y cultivos primarios obtenidos de tumores de mama humanos, en los que se ha detectado expresión y activación del receptor VEGFR1 (Lee et al. 2007) y de VEGFR2 (Weigand et al. 2005).

En cuanto a la función de AIB1 en angiogénesis, cuando comenzamos a trabajar en este proyecto no se había publicado nada al respecto. Existían muchos estudios sobre la influencia de AIB1 en el crecimiento normal y canceroso de células epiteliales, pero poco había sido descrito sobre su función en las células del estroma. Sin embargo, estudios recientes apuntan a que AIB1 participa en el proceso de angiogénesis.

En primer lugar, la eliminación de AIB1 en células endoteliales humanas de cordón umbilical (HUVEC), provoca una disminución de la proliferación y la migración necesarias para que funcionen correctamente creando la monocapa que recubre un vaso sanguíneo. Mediante el uso de ratones *SRC-3^{+/-}* y *SRC-3^{-/-}* se ha comprobado que para una cicatrización correcta es necesaria la presencia de los dos alelos de *SRC-3* y que AIB1 interacciona con la señalización de FGF (factor de crecimiento fibroblástico) para regular este proceso. Los ratones *SRC-3^{+/-}* ya presentan una neoangiogénesis y reparación del tejido muy defectuosa, y esto no empeora al delecionar el otro alelo de *SRC-3* (*SRC-3^{-/-}*). Los ratones *SRC-3^{-/-}* son viables tras el nacimiento y no tienen un fenotipo vascular diferente, sin embargo, se ha visto que la fertilidad y el número de crías por parto es menor. Esto puede deberse a una pobre implantación uterina de los embriones, proceso que requiere un recubrimiento del útero con vasos sanguíneos. La defectuosa cicatrización de los ratones *SRC-3^{+/-}* es evidente a distintos niveles además del histológico. A nivel de expresión génica, los niveles de FGFR1, FGFR3, FGF10 y FGFBP3 se reducen comparando con ratones *SRC-3^{+/-}*. El reclutamiento de células inflamatorias como macrófagos y monocitos hacia el tejido dañado también es menor, al igual que la

detección de VEGF-A por inmunohistoquímica. Por último, la actividad de las metaloproteasas (necesaria para el remodelado de la matriz extracelular) se mantiene igual tras la herida e incluso decrece progresivamente en los ratones *SRC-3^{+/-}* (Al-Otaiby et al. 2012).

AIB1 es un coactivador de factores de transcripción como AP-1 y SP1 (Liao et al. 2002; Mussi et al. 2006). A su vez SP-1 es un factor de transcripción importante en la regulación de la expresión de VEGFR2 (Meissner et al. 2004). Recientemente se ha demostrado que AIB1 se une a SP1 para activar la transcripción de VEGFR2 (Wang et al. 2014a). La formación de este complejo transcripcional es promovida por ERK3, la cual fosforila y activa a AIB1 (Long et al. 2012).

3.3 Papel de AIB1 en el inicio y progresión tumoral.

La sobreexpresión de AIB1 se ha relacionado con cáncer en humanos y en ratones. AIB1 se identificó inicialmente como un gen amplificado en la región cromosómica humana 20q12 en cánceres de mama y ovario (Anzick et al. 1997). Actualmente se ha detectado amplificación del gen y/o sobreexpresión de la proteína en numerosos tipos de cáncer: de mama (Anzick et al. 1997), de ovario (Tanner et al. 2000), de endometrio (Sakaguchi et al. 2007), de esófago (Xu et al. 2007), gástrico (Sakakura et al. 2000), pancreático (Guo et al. 2014; Henke et al. 2004), hepático (Xu et al. 2010), de próstata (Tien et al. 2014; Zhou et al. 2005), colorrectal (Mo et al. 2014; Xie et al. 2005), de vejiga (Luo et al. 2008), nasofaríngeo (Liu et al. 2008a), de pulmón (Cai et al. 2010), meningiomas (Carroll et al. 2000), prolactinomas (Carretero et al. 2013).

El papel de AIB1 en la iniciación tumoral ha sido ampliamente estudiado. Se han empleado numerosos modelos murinos para intentar entender la función de AIB1 en cáncer, sobre todo de mama. Los ratones que sobreexpresaban AIB1 en el epitelio mamario bajo el control del promotor MMTV, desarrollaban lesiones hiperplásicas y mayor incidencia de tumores en la glándula mamaria (Torres-Arzuayus et al. 2004). El análisis de estos tejidos reveló que AIB1 funcionaba como

un oncogén activando la vía de señalización IGF-I/PI3K/AKT al aumentar los niveles de IGF-I circulantes. Por otra parte, también se generó el modelo murino que expresaba la isoforma truncada de AIB1 (AIB1-Δ3) bajo el control del promotor de expresión constitutiva CMV (Tilli et al. 2005). Aunque no se observaron tumores, estos ratones mostraban hiperplasia de la glándula mamaria y niveles aumentados de ciclina D1 y de IGF-IR. En nuestro laboratorio también se creó un modelo transgénico que expresaba niveles moderados de AIB1 con objeto de estudiar los primeros eventos que ocurren en cáncer de mama. Al igual que en el modelo AIB1-Δ3, los ratones no generaron tumores. Sin embargo, se observó una mayor hiperplasia mamaria durante el inicio de la pubertad, sugiriendo que la sobreexpresión de AIB1 podía representar uno de los cambios preneoplásicos en el tejido mamario (Avivar et al. 2006). En consonancia con estos resultados, ratones *knockout* para AIB1 y portadores del oncogén Ras (*SRC-3^{-/-}/MMTV-v-ras*) presentaban una menor incidencia de tumores en la glándula mamaria que los ratones portadores tanto de AIB1 como de Ras (*SRC-3^{+/+}/MMTV-v-ras*) (Kuang et al. 2004). En la misma línea, la delección de AIB1 en ratones tratados con el carcinógeno dimetilbenz[α]antraceno (DMBA), ejerció un efecto protector frente a la carcinogénesis de la mama (Kuang et al. 2005). Por otra parte, en los ratones transgénicos de oncogenes conocidos que sí generan tumores, la pérdida de AIB1 disminuye la incidencia tumoral y bloquea las metástasis, como *MMTV/v-Ha-ras* (Kuang et al. 2004) y *MMTV-Neu* en mama (Fereshteh et al. 2008), TRAMP en próstata (Chung et al. 2007) y TRβPV/PV en tiroides (Ying, Willingham, Cheng 2008). Estos resultados sugieren que el bloqueo de la función de AIB1 podría ser una buena aproximación para suprimir la tumorigénesis. Por lo tanto, conocer los factores que influyen los niveles y la actividad de este coactivador es de gran importancia a la hora de determinar el potencial oncogénico de un tejido.

Como un regulador clave en el crecimiento celular y el desarrollo del organismo, AIB1 funciona como nexo entre muchas rutas de señalización intracelulares que son críticas para el inicio del tumor y la posterior metástasis (**Figura 11**).

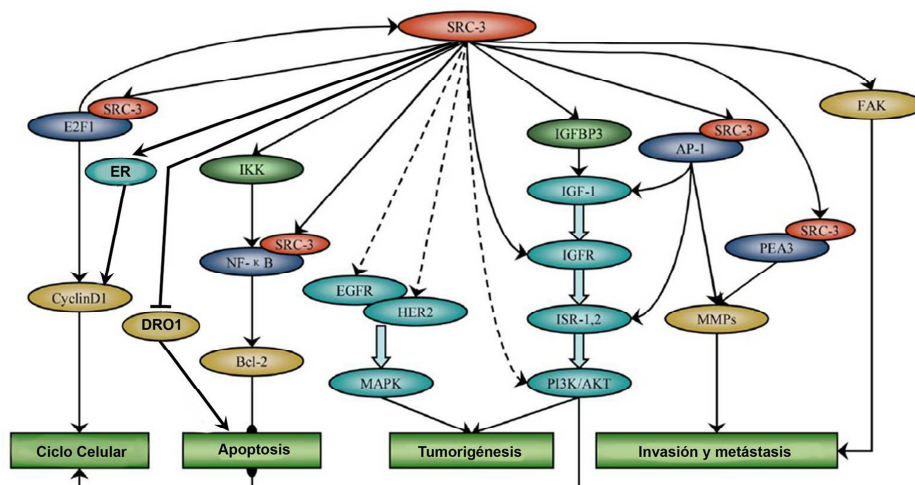


Figura 11. AIB1: un gen coordinador de varias rutas de señalización. AIB1 puede coactivar tanto a receptores nucleares como a otros factores de transcripción, incluso reprimir a genes supresores de tumores como DRO1. AIB1 promueve progresión del ciclo celular al coactivar a E2F1 y activar a AKT. AIB1 activa la transcripción de IGF-I y EGF, promoviendo la fosforilación de IGF-IR, EGFR, HER2 y AKT, e induce tumorigénesis. Por otra parte, AIB1 inhibe la apoptosis al activar la ruta de NF-κB y al reprimir genes proapoptóticos como DRO-1. Además, promueve invasión y metástasis al coactivar a AP-1 y PEA3 y al activar a FAK. Figura modificada de (Ma et al. 2011).

3.3.1 Señalización dependiente de hormonas.

Las hormonas sexuales tales como estrógenos, andrógenos y progesterona afectan al crecimiento y la función de los órganos reproductores, al desarrollo de las características sexuales y a patrones de comportamiento en los animales. Sin embargo, estas hormonas también están implicadas en enfermedades como el cáncer de mama, ovario, endometrio y próstata. Dado que las hormonas esteroideas ejercen su función a través de receptores nucleares y AIB1 es un coactivador de estos, es razonable pensar que la sobreexpresión de AIB1 junto con una alta exposición a esteroides resulta en una mayor actividad de los receptores nucleares. En este sentido, la amplificación y la sobreexpresión de

AIB1 han sido correlacionadas con la presencia de receptor de estrógenos (ER) y de receptor de progesterona (PR) en cáncer de mama y de ovario (Bautista et al. 1998; Kurebayashi et al. 2000; Tanner et al. 2000). Se ha demostrado que AIB1 y ER se asocian y de hecho colocalizan en los núcleos de células positivas para ER (Azorsa, Cunliffe, Meltzer 2001), donde AIB1 se requiere para la unión de ER a los promotores de sus genes diana. El tratamiento con 17- β -estradiol induce un incremento en la ocupación de los promotores de los genes CATD, pS2 y c-Myc por parte de AIB1 y ER en células MCF-7, por el contrario la supresión de AIB1 con RNA de interferencia disminuye la asociación entre ER y estos promotores (Shang et al. 2000). Por el contrario, la delección de AIB1 en células MCF-7 redujo la proliferación dependiente de estrógenos al disminuir la capacidad de estas hormonas de inhibir la apoptosis (List et al. 2001). De este modo se ha postulado que AIB1 está implicado en la progresión del cáncer al sobreestimar la función de ER. De hecho, se ha observado que durante la tumorigénesis de cáncer de mama hay un aumento significativo de la señalización de ER en tumores ER positivos. Esto se debe a un incremento en los niveles de expresión de factores que activarían su función (Murphy et al. 2000). Hay que destacar que la isoforma AIB1- Δ 3 tiene una mayor eficacia a la hora de activar a ER α , probablemente, porque al perder el dominio bHLH/PAS está más disponible para los receptores nucleares. Los tumores que sobreexpresan esta isoforma pueden presentar una mayor proliferación celular inducida por estrógenos (Reiter et al. 2004). Estas observaciones sugieren que la sobreexpresión de AIB1 contribuiría a la tumorigénesis al sobreestimar la transcripción mediada por los receptores esteroideos. Sin embargo, aunque es probable que niveles elevados de AIB1 contribuyan a la progresión del cáncer a través de este mecanismo en tumores endocrinos, la sobreexpresión de AIB1 también ha sido observada en tumores y líneas celulares ER, PR y AR negativos (Bouras, Southey, Venter 2001), sugiriendo que existen mecanismos independientes de hormonas en el proceso cancerígeno estimulado por AIB1.

3.3.2 Señalización independiente de hormonas.

Ruta IGF/PI3K/AKT

Entre las diferentes rutas con las que interacciona AIB1, la ruta de IGF-I/PI3K/AKT ha sido la más estudiada y la mejor caracterizada. Modelos animales y estudios en tumores humanos y líneas celulares han demostrado que AIB1 está implicado en la regulación de la actividad de AKT y en los niveles de expresión de componentes de la ruta IGF/PI3K/AKT, implicada en el control de diversos procesos biológicos, como el metabolismo, la supervivencia celular y la proliferación (Franke 2008). La relación de AIB1 con esta vía de señalización celular se detallará más adelante en el apartado 5 de la Introducción.

Ruta ErbB/HER

Varios estudios han demostrado el papel clave que juegan los receptores tirosina quinasa en la formación y la progresión del cáncer. En oncología la familia ErbB/HER es una de las rutas de señalización tirosina quinasa más importantes (Holbro, Civenni, Hynes 2003). La familia HER también conocida como familia EGFR está compuesta por 4 miembros principales, conocidos con el nombre de EGFR/HER1/ERBB1, HER2/neu/ERBB2, HER3/ERBB3 y HER4/ERBB4 (Lemmon, Schlessinger, Ferguson 2014). La unión de estos receptores a factores de crecimiento epidérmico (EGF) inicia una cascada de activación de diversas quinasas que finaliza en la expresión de numerosos genes que median procesos celulares como la proliferación, la diferenciación, la migración y la apoptosis (Holbro, Civenni, Hynes 2003).

Se ha observado una correlación entre la sobreexpresión de AIB1 y HER2/neu en tumores de mama (Bouras, Southey, Venter 2001; Thorat et al. 2008). Además, AIB1 es una diana para las quinasas activadas por EGFR tales como ERK1/2 y c-Abl (Font de Mora and Brown 2000; Oh et al. 2008). Recientemente también se ha visto que ERK3, un miembro más desconocido de

esta familia de quinasas, también fosforila y activa a AIB1 (Long et al. 2012). La fosforilación de AIB1 por estas quinasas promueve su localización nuclear y estimula la transactivación de ER α al aumentar la interacción con CBP/p300. Por otro lado tanto AIB1 como la isoforma AIB1- Δ 3 pueden potenciar la señalización a través de HER2/neu al aumentar sus niveles de fosforilación (Fereshteh et al. 2008; Lahusen et al. 2007). De hecho se crea una retroalimentación positiva en la cual AIB1 aumenta la señalización de HER2/neu y esta a su vez estimula la función de AIB1 como coactivador. La sobreexpresión de AIB1 podría constituir un mecanismo de resistencia a fármacos inhibidores de la actividad de HER2/neu como trastuzumab (herceptina). En algunos casos, esta resistencia se ha atribuido a la señalización por IGF-IR, la cual es promovida por AIB1 (Nahta et al. 2005).

Ruta NF- κ B

Los factores nucleares κ B comprenden una familia de factores de transcripción implicados en la expresión de genes que controlan la respuesta inmune e inflamatoria además del ciclo celular y la apoptosis (Perkins 2007). Los factores NF- κ B son dímeros de proteínas que cuando están inactivas se encuentran retenidas en el citosol por proteínas inhibidoras conocidas como I κ B. La exposición de la célula a citoquinas, como la interleuquina-1 (IL-1) o el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), lleva a la activación del complejo quinasa I κ B (complejo IKK) que fosforila a I κ B, provocando su degradación. Una vez liberado del complejo inhibidor, NF- κ B es translocado al núcleo donde transactivará la expresión de numerosos genes. Por un lado, AIB1 puede interaccionar y potenciar la transcripción mediada por NF- κ B (Werbajh et al. 2000), pero además, en respuesta a TNF- α , el complejo IKK puede fosforilar a AIB1 desencadenando su translocación al núcleo donde encuentra y coactiva a NF- κ B (Wu et al. 2002). El tratamiento con estrógenos también aumenta la fosforilación de AIB1 (Wu et al. 2004; Zheng et al. 2005). Se ha demostrado que IKK α media la fosforilación tanto de AIB1 como de ER α en respuesta a estrógenos para activar la expresión de ciclina D1 y promover el ciclo celular (Park et al. 2005).

Cabe destacar que IKK también puede activarse por AKT, dando lugar a la activación de NF- κ B (Ozes et al. 1999). Debido a que la sobreexpresión de AIB1 aumenta la actividad AKT, éste podría representar otro posible mecanismo por el cual AIB1 promovería la expresión de la ciclina D1 y la progresión en el ciclo celular.

Ruta Rb/E2F1

El ciclo celular en mamíferos es un proceso orquestado por la expresión y activación de una serie de genes que forman un entramado altamente organizado y regulado. La ruta Rb/E2F1 regula la transición de la fase del ciclo celular G1 a S y constituye un mecanismo regulador clave en el ciclo celular (Fang and Han 2006). La desregulación de cualquier proceso que controle el ciclo celular está frecuentemente asociada con anomalías en el crecimiento incluyendo cáncer. AIB1 juega un papel importante en la progresión del ciclo celular como coactivador de E2F1. De este modo, AIB1 promueve proliferación celular al estimular la expresión de genes de respuesta a E2F1 como ciclina A, ciclina E, ciclina B, Cdk2, p107 y el propio E2F1 (Louie et al. 2004). El aumento de la proliferación ocurre incluso en presencia de compuestos antiestrogénicos, indicando de nuevo que AIB1 puede funcionar de modo independiente de hormonas esteroideas. Mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) se ha observado que el complejo E2F1/AIB1 es reclutado al propio promotor de AIB1, sugiriendo una retroalimentación positiva que mantiene elevados los niveles de AIB1 y E2F1 (Louie et al. 2006; Mussi et al. 2006).

3.3.3 Influencia de AIB1 en genes supresores de tumores.

Recientemente estudios realizados en nuestro grupo han decubierto que AIB1 actúa como un regulador negativo de la expresión del factor proapoptótico DRO1 (Ferragud et al. 2011), un gen supresor de tumores que se ha visto reprimido por otros oncogenes en cáncer de colon y páncreas (Bommer et al.

2005). DRO1 juega un papel importante en adipogénesis al regular negativamente la señalización de Wnt/ β -catenina e inducir C/EBP α y PPAR γ (Tremblay et al. 2009). La expresión de DRO1 fue significativamente reducida en las células epiteliales mamarias de ratón y en células de mama humanas que sobreexpresaban AIB1 (Ferragud et al. 2011). Además, la expresión de DRO1 disminuyó en células MCF-7 tratadas con estrógenos y aumentó cuando se trataron con tamoxifeno.

Otro estudio identificó mediante ensayos de ChIP a una nueva proteína que interacciona con AIB1, el supresor de tumores 53BP1, una proteína de respuesta a daño en el DNA. AIB1 y 53BP1 ocupan la misma región del promotor del gen BRCA1, y son necesarias para su expresión en células HeLa (Corkery et al. 2011). Estos resultados sugieren otro posible mecanismo por el que AIB1 promueve el desarrollo de cáncer, a través de la represión de genes supresores de tumores (Chang and Wu 2012).

3.3.4 Implicación de AIB1 en migración, invasión y metástasis.

Para que la metástasis tenga lugar las células cancerosas necesitan adquirir la capacidad de migrar para invadir los tejidos cercanos, entrar en el torrente sanguíneo y poder llegar a tejidos distantes. Un evento importante en este proceso es la transición epitelio-mesénquima o EMT. Durante la EMT, las células epiteliales reprimen la expresión de E-caderina, lo que les hace perder la adhesión que existe entre ellas y adquirir capacidad de migración. Se conocen varios factores de transcripción, como Twist y Snail, que reprimen la expresión de esta caderina (Huber, Kraut, Beug 2005; Yang et al. 2004). Sin embargo, para que la migración y la invasión sean posibles, las células también deben adquirir la capacidad de destruir barreras biológicas, como la membrana basal. Este propósito puede alcanzarse gracias a la acción de metaloproteasas (MMPs) que degradan proteínas de la matriz extracelular.

La primera evidencia de que AIB1 participaba en migración celular e invasión surgió del estudio del ovario de la mosca de la fruta. Se demostró que

mutaciones en *Taiman*, ortólogo de AIB1 en *Drosophila*, causaba defectos de migración de las células del borde del ovario (Bai, Uehara, Montell 2000).

Un estudio complementario reveló que las células MCF-7 (línea celular de cáncer de mama) respondían al tratamiento con 17- β -estradiol extendiendo lamelipodios y que este comportamiento era bloqueado en presencia de antiestrógenos (DePasquale 1999). Estas observaciones indicaban que los esteroides podían estimular el comportamiento invasivo de las células.

Un estudio reciente ha correlacionado a AIB1 con niveles elevados de Smad-2 (proteína efectora en la señalización por TGF- α) y los marcadores de EMT, β -catenina, Twist y vimentina (Kajiro et al. 2009). Por tanto, la sobreexpresión de AIB1 podría conferir una ventaja invasiva a través de la expresión de Twist.

El estudio más relevante de la función de AIB1 en metástasis proviene del modelo murino transgénico *MMTV-PyMT* (modelo de cáncer de mama). La ausencia de AIB1 en los ratones transgénicos *MMTV-PyMT* redujo significativamente la metástasis hacia el pulmón desde los tumores mamarios (Qin et al. 2008). Estudios moleculares mostraron que AIB1 podía influir en los niveles de expresión de metaloproteasas (MMPs) que permiten a las células tumorales penetrar la matriz extracelular para invadir el estroma. En cultivos de células humanas MDA-MB-231 y células tumorales PyMT, AIB1 regula los niveles de MMP2 y MMP9 al coactivar al factor de transcripción PEA3 (miembro de la familia de factores de transcripción Ets).

En células de cáncer de mama humanas MDA-MC-231, AIB1 también actúa como coactivador de AP-1 para promover la expresión de MMP7 y MMP10 (Li et al. 2008). En cáncer próstata AIB1 coactiva simultáneamente a AP-1 y PEA3 para aumentar la expresión de MMP2 y MMP13 (Yan et al. 2008). En células de cáncer de pulmón AIB1 es fosforilado por ERK3, lo que facilita su interacción con PEA3 para promover la transcripción de MMPs (Long et al. 2012). Recientemente, AIB1 también ha sido asociado a ER81 (otro miembro de la familia Ets). La interacción con este factor de transcripción promueve la expresión de MMP-1. En este proceso está implicado el receptor HER2/neu que activa a ER81 y a sus

coactivadores, AIB1 y p300, facilitando la transcripción mediada por este factor (Goel and Janknecht 2004).

Estos datos indican que AIB1 claramente promueve invasión en cáncer al coactivar factores de transcripción que regulan la expresión génica de diferentes metaloproteasas.

Por otra parte, se ha visto que la inhibición de la expresión de AIB1 produce una alteración en la localización subcelular de la quinasa de adhesión focal (FAK) promoviendo la movilidad de las células de carcinoma ovárico (Yoshida et al. 2005). Por el contrario, la sobreexpresión de AIB1 estimula la activación de FAK y la invasividad en carcinoma de próstata (Yan et al. 2008).

La isoforma de AIB1 que carece del exón 4 (SRC-3Δ4) también ha sido implicada en la activación de metástasis. SRC-3Δ4 es fosforilada en el citosol por la quinasa 1 activada por p21 (PAK-1), tras lo cual se dirige a la membrana plasmática donde actúa de puente entre EGFR y FAK (Long et al. 2010) activando la cascada de señalización EGF-FAK-cSrc que promueve la migración de las células cancerosas.

3.3.5 Implicación de AIB1 en angiogénesis tumoral.

Hace más de 150 años, Rudolf Virchow vio que el daño en un tejido y la reparación es parte del proceso maligno, de hecho, los tumores fueron descritos como “heridas que no cicatrizarán” (Virchow, 1863). A nivel celular y molecular, existen muchos paralelismos entre la cicatrización de una herida y los procesos que ocurren en el tumor y tejidos que lo rodean. Un componente importante de la curación de una herida es la formación de nuevos vasos sanguíneos, proceso que es finamente controlado por una serie de genes que se desregulan en los tumores.

Actualmente, no se ha publicado ningún estudio que se centre exclusivamente en el papel de AIB1 en la angiogénesis tumoral. Sin embargo, existen indicios que llevan a pensar que AIB1 puede tener un papel importante en este evento inducido muy tempranamente en el proceso tumoral.

En primer lugar, recientemente se ha descrito que AIB1 es necesario para la cicatrización de heridas en ratones y para la correcta función de las células endoteliales (Al-Otaiby et al. 2012). AIB1 y la familia de ligandos FGF a la que coactiva, se han visto incrementados en el estroma de cáncer de mama, con lo que sería lógico pensar que AIB1 promoviera angiogénesis en el compartimento estromal. Por otro lado la delección de AIB1 en ratones retrasa el desarrollo de los tumores inducidos por HER2/neu. Se cree que la limitación esta tumorigénesis podría deberse a una limitación de la expresión de AIB1 en el estroma (Fereshteh et al. 2008).

En un modelo de cáncer de tiroides en el que se deleciona AIB1, se ha visto que los niveles de expresión de VEGF-A en las tiroides de los ratones deficientes en AIB1 se redujeron en un 40%, indicando que la deficiencia de AIB1 podría suprimir la neovascularización al reprimir la expresión de VEGF-A (Ying, Willingham, Cheng 2008). Por último, AIB1 coopera con HIF-1 α para activar la expresión de MIF, y HIF-1 α es un factor de transcripción que se une al promotor de VEGF para activar su transcripción (Wu et al. 2012).

3.3.6 Implicación de AIB1 en resistencia del tumor a quimioterapia y a terapia endocrina.

AIB1 ha sido relacionado con la resistencia a agentes quimioterapéuticos. El tamoxifeno es un antagonista que compite con los estrógenos por la unión al receptor de estrógenos inhibiendo la interacción con coactivadores y la transcripción de genes diana (Shiau et al. 1998). El tamoxifeno ha sido la terapia endocrina estándar para mujeres con cáncer de mama ER positivo. Sin embargo, sólo el 50% de estas pacientes responden a la terapia con tamoxifeno (Osborne 1998). Otras pacientes tratadas con tamoxifeno durante largos periodos de tiempo tienden a adquirir resistencia a la terapia. La resistencia a terapia endocrina a menudo se ha asociado con la activación de rutas de señalización de factores de crecimiento como la ruta EGFR (Osborne et al. 2005). Existe una correlación positiva entre la expresión de AIB1 y los niveles proteicos de la familia HER en

pacientes con cáncer de mama recurrente después del tratamiento con tamoxifeno (Osborne et al. 2003). Se ha demostrado que PAX2 compite con AIB1 por la unión y regulación de la transcripción de HER2. Una expresión elevada de AIB1 se ha asociado con una tasa elevada de recurrencia de tumores ER positivos en pacientes tratadas con tamoxifeno (Hurtado et al. 2008).

Otro tipo de agente terapéutico endocrino, los inhibidores de aromatasa, actúan bloqueando la conversión de testosterona y androstenediona en estrógenos. Los inhibidores de aromatasa se usan para tratar a mujeres postmenopáusicas con cáncer de mama ER α positivo. Sin embargo, los tumores de mama con expresión elevada de HER2 y de AIB1 también pueden desarrollar resistencia a los inhibidores de aromatasa (McBryan et al. 2012).

En un estudio clínico con líneas celulares de cáncer de próstata tratadas con Bortezomib (Velcade), un inhibidor del proteasoma con actividad anticancerígena, se encontró un incremento inesperado en la proliferación de las células tratadas que coincidía con elevados niveles de AIB1 y de AKT fosforilado. La eliminación de AIB1 disminuyó el nivel de AKT fosforilado. Estos datos sugieren que AIB1 puede contribuir a la quimiorresistencia en cáncer de próstata. (Ayala et al. 2008)

También se ha relacionado a AIB1 con la inhibición de la autofagia, un mecanismo por el cual promueve quimiorresistencia y tumorigénesis. La autofagia o muerte celular programada tipo 2, es un proceso altamente regulado envuelto en numerosas funciones fisiológicas incluyendo reciclado de organelas y degradación proteica. Se ha propuesto que la supresión de la muerte por autofagia promueve el desarrollo de cáncer. Un estudio reciente ha identificado al factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) como diana de AIB1. Este gen es un supresor de muerte por autofagia. La supresión de MIF o AIB1 en células de cáncer de mama MCF-7, reduce la viabilidad celular por activación de la autofagia. La reducción de la expresión de MIF se asocia con una tumorigénesis reducida y un aumento en la sensibilidad a agentes quimioterapéuticos como doxorubicina y etopósido. AIB1 coopera con HIF-1 α para activar la expresión de MIF. La supresión de la autofagia

se postula como un nuevo mecanismo por el cual AIB1 incrementa la quimiorresistencia y tumorigénesis (Wu et al. 2012).

AIB1 juega un papel importante en la resistencia a estrés citotóxico. Se ha visto que la expresión de AIB1 está positivamente correlacionada con la del factor 4 asociado al receptor de TNF (TRAF4) en cánceres de mama humanos. De un modo similar a lo que sucede en células de cáncer de mama que sobreexpresan AIB1, las células que sobreexpresan TRAF4 son más resistentes a la muerte inducida por estrés. La sobreexpresión de AIB1 y TRAF4 disminuye los niveles de la proteína p53 inducida por estrés citotóxico, y la expresión de genes proapoptóticos regulados por p53 (Yi et al. 2013).

Con todo ello, mediante la integración de todas estas vías de señales celulares implicadas en el inicio y progresión tumoral, AIB1 juega una función pleiotrópica de las funciones biológicas necesarias para la progresión del cáncer (**Figura 12**).

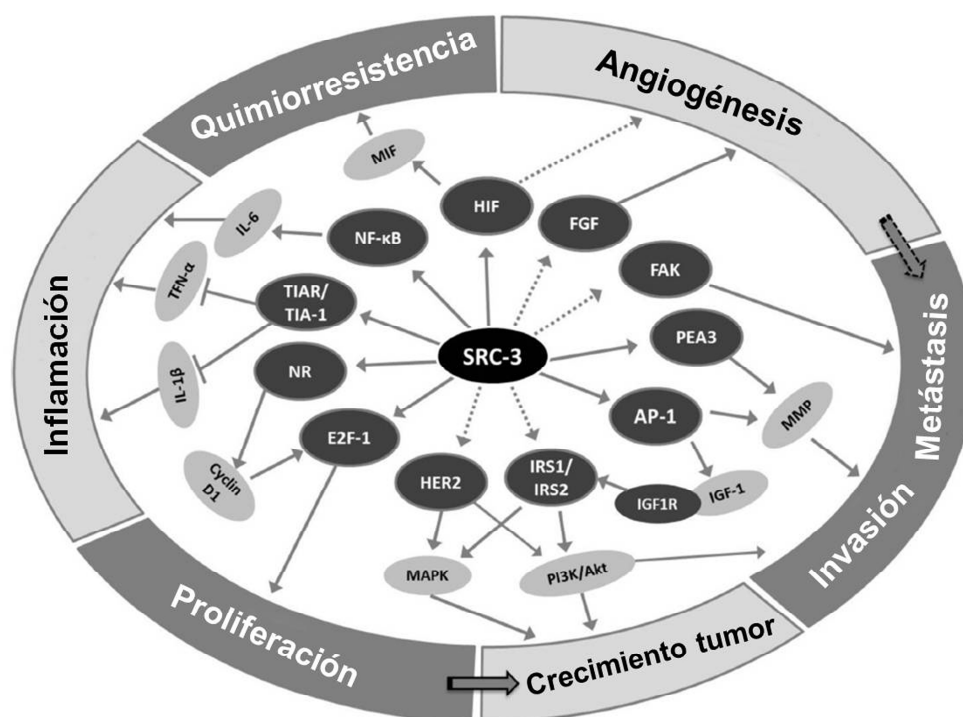


Figura 12. AIB1 como mediador de las funciones adquiridas por los tumores. Dependiendo del contexto celular, AIB1 puede coactivar a diferentes receptores nucleares y factores de transcripción para promover el desarrollo tumoral. Coactiva a receptores nucleares y a E2F1 para promover crecimiento y división celular. Coactiva a AP-1 y activa la ruta IGF-I/AKT para facilitar la expansión tumoral. AIB1 también es un factor pro-metastásico, coactivando a PEA3 y AP-1 y sirviendo como adaptador para FAK, para aumentar la expresión de metaloproteasas. También se une a NFκB promoviendo inflamación y aumenta la expresión de MIF a través del factor de transcripción HIF, contribuyendo a la quimiorresistencia y la angiogénesis mediante la ruta FGF. Las flechas sólidas indican interacción directa o rutas conocidas, mientras que las flechas punteadas indican interacción indirecta (Tien and Xu 2012).

3.3.7 Regulación de los niveles y actividad de AIB1 a nivel postraducciona.

La expresión de AIB1 y sus niveles de proteína pueden ser regulados a tres niveles: transcripción, traducción y degradación proteica.

A nivel de RNA mensajero (mRNA), el promotor de AIB1 se encuentra regulado por los factores de transcripción E2F1 y SP1. Mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) se ha observado que el complejo E2F1/AIB1 es reclutado al propio promotor de AIB1, sugiriendo una retroalimentación positiva que mantiene elevados los niveles de AIB1 y E2F1 (Louie et al. 2006; Mussi et al. 2006). Este resultado podría explicar un mecanismo para conseguir altos niveles de AIB1 independientemente de su amplificación génica.

Los estrógenos también pueden regular los niveles totales de mRNA de AIB1. En células MCF-7 se ha visto que el 17- β -estradiol bloquea la transcripción de AIB1 y que esta inhibición es revertida tras la adición de antiestrogénicos o de ácido retinoico (Lauritsen et al. 2002). Este efecto puede tener gran importancia para la progresión del cáncer y para explicar la resistencia endocrina al aumentar los niveles de AIB1 en presencia de antiestrogénicos.

A nivel traduccional, AIB1 puede ser regulado por microRNAs (miRNAs) endógenos. Los miRNAs son pequeñas moléculas de RNA de simple cadena que bloquean la expresión de los RNAs para los que son complementarios, inhibiendo la traducción a proteína. El estudio de microRNAs está cobrando mucha importancia en los últimos años, ya que pueden convertirse en potenciales fármacos anticancerígenos. El estudio del perfil de microRNAs para definir molecularmente a cada tumor en cáncer de mama, y poder con ello individualizar la terapia, ya se está estudiando actualmente en pacientes con cáncer de mama triple negativo (Pena-Chilet et al. 2014).

Se ha visto que el microRNA miR-17-5p inhibe la traducción de AIB1. Además, en líneas de cáncer de mama se han observado niveles reducidos de Mir-17-5p, coincidiendo con una expresión elevada de AIB1 (Hossain, Kuo, Saunders 2006). Este mismo microRNA se ha visto implicado en cáncer de colon. La introducción de miR-17-5p en células de cáncer de colon revirtió el efecto proliferativo ejercido por ER β , mientras que su represión afecta a la muerte celular inducida por daño celular y a la regulación de los niveles de AIB1 (Edvardsson et al. 2013).

Otro microRNA recientemente descrito que podría regular la expresión proteica de AIB1 en células de carcinoma hepatocelular es el miR-195 (Jiang et al. 2014). Este mismo microRNA se había relacionado unos años antes con cáncer de mama. Se ha encontrado que los niveles de miR-195 están específicamente elevados en tumores de mama frente a otros tipos de cáncer, y se ha postulado como un potencial biomarcador para detectar cáncer de mama en estadios tempranos, no invasivos (Heneghan et al. 2010).

Por último, recientemente se ha descrito que miR-137 regula la traducción de AIB1. La transfección de miR-137 en células de cáncer de mama, melanoma y cáncer de próstata, disminuyeron los niveles de proteína de SRC-1, SRC-2 y muy drásticamente de AIB1. Este micro-RNA está silenciado epigenéticamente en tejidos de cáncer humanos y líneas celulares. Estos resultados apoyan el desarrollo de terapias basadas en el uso de miR-137 contra la familia de oncogenes p160 en cáncer (Eedunuri et al. 2015).

En cuanto a la regulación de AIB1 a nivel de proteína, diversos estudios han demostrado que las vías de señalización activadas por hormonas, citoquinas y factores de crecimiento inducen múltiples modificaciones postraduccionales en AIB1, incluyendo acetilación, ubiquitinación, sumoilación, metilación y fosforilación. Estas modificaciones, a menudo reversibles, pueden afectar la función de AIB1 al regular interacciones proteína-proteína, la localización subcelular de este coactivador y/o su estabilidad (York and O'Malley 2010). La fosforilación ha sido la modificación postraducciona l más estudiada en AIB1, la cual está mediada por MAPKs, IKK, glucógeno sintasa quinasa (GSK3), caseína quinasa 1δ (CK1δ), PKCζ y c-Abl. Además de estas proteínas ya conocidas, recientemente se ha descrito que ERK3 también fosforila a AIB1 (Long et al. 2012).

La regulación del recambio de AIB1 está mediada por las rutas de degradación del proteasoma (Lonard and O'Malley 2008). El proteasoma es un complejo proteico no lisosómico que se encarga de degradar proteínas dañadas, proteínas mal plegadas o proteínas cuya función ya no es necesaria para la célula eucariótica. El proteasoma 26S reconoce y degrada proteínas poliubiquitinadas. Se conocen 3 ubiquitina ligasas para AIB1: E6AP, Fbw7α y CHIP (Kajiro et al.

2009; Mani et al. 2006; Wu et al. 2007). Sin embargo, AIB1 también puede ser degradado por el proteasoma de manera independiente de ubiquitina y de ATP (Li et al. 2006).

El gen supresor de tumores PTEN puede regular la ubiquitinación y de este modo la estabilidad proteica de AIB1. PTEN interacciona con AIB1 a través de su dominio fosfatasa y regula la actividad transcripcional de AIB1 al promover su degradación por el proteasoma. Este proceso no parece requerir la actividad fosfatasa de PTEN, sino que implica la interacción de PTEN con Fbw7 α (Yang et al. 2013).

3.3.8 AIB1: potencial diana anticancerígena.

Desde el descubrimiento y la caracterización de AIB1 en 1997 se han realizado numerosos estudios para correlacionar este coactivador con la progresión del cáncer y con la respuesta a las terapias endocrinas. Como factor pronóstico, los pacientes con tumores que sobreexpresan AIB1 presentan tiempos más cortos de supervivencia libre de enfermedad tras la extirpación del tumor (Zhao et al. 2003). La longitud de la cola de poliglutaminas (poliQ) de AIB1 puede ser un marcador que predice riesgo de padecer cáncer de ovario epitelial (Han et al. 2014).

En cuanto a la resistencia a fármacos, la resistencia a tamoxifeno se ha relacionado con la expresión de AIB1 en las células tumorales junto a otras moléculas como HER2/neu (Osborne et al. 2003), ER α (Schiff et al. 2003) y el factor de transcripción PAX2 (Hurtado et al. 2008). AIB1 se considera predictor de recurrencia de cáncer de mama en pacientes tratadas con tamoxifeno (Tabarestani et al. 2014). También se ha relacionado con resistencia a inhibidores de aromatasa (McBryan et al. 2012) y a inhibidores del proteasoma como Bortezomib usado en cáncer de próstata (Ayala et al. 2008). Como AIB1 es necesario para la actividad oncogénica de HER2/neu y RAS (Kuang et al. 2004; Fereshteh et al. 2008), es razonable pensar que la disminución de los niveles y/o

la actividad de este coactivador podrían mejorar el éxito de las terapias dirigidas a bloquear la señalización mediada por HER2/neu y RAS en cáncer.

Varias aproximaciones preliminares han sido desarrolladas para inhibir la acción de AIB1. En primer lugar, se ha tratado de buscar un modo de evitar la unión de AIB1 al ER y sus ligandos (Gunther et al. 2009). También se está valorando la posibilidad del uso de inhibidores de la unión de ER al DNA, como la disulfido benzamida (DIBA). Este compuesto bloquea la transactivación mediada por ER α , tanto dependiente como independiente de ligando, y bloquea el crecimiento celular de tumores resistentes a tamoxifeno (Wang et al. 2006). Estas moléculas podrían, por tanto, proporcionar una alternativa a la terapia endocrina convencional.

Por otra parte en estos últimos años se han identificado dos posibles inhibidores selectivos de AIB1 y SRC-1: Bufalina y Gossypol. La bufalina es un glucósido cardíaco que se obtiene de la piel de los sapos. Esta pequeña molécula es un potente inhibidor de AIB1 y SRC-1 ya que promueve la degradación proteica y bloquea el crecimiento de las células tumorales a dosis nanomolares. Cuando la bufalina se incorpora a un sistema de entrega de nanopartículas es capaz de reducir el crecimiento tumoral en un modelo murino de xenoinjerto de cáncer de mama (Wang et al. 2014b). Gossypol es un compuesto derivado de la planta del algodón que inhibe parcialmente la función de AIB1 y de SRC-1 en cultivos celulares de cáncer de mama, próstata, pulmón e hígado reduciendo selectivamente sus niveles proteicos (Wang et al. 2011). Gossypol puede unirse directamente a AIB1 y reducir sus niveles proteicos sin afectar al mRNA. También puede reducir los niveles de mRNA de Bcl-2. Identificado como un agente proapoptótico en células cancerosas, está siendo evaluado como agente terapéutico en ensayos clínicos, solo o en combinación con otros fármacos, en numerosos tipos de cáncer, incluyendo próstata y pulmón (Baggstrom et al. 2011).

Estas terapias, junto con las basadas en microRNAs comentadas anteriormente, podrían representar un nuevo horizonte en la lucha contra el cáncer, diseñando terapias encaminadas a inducir la expresión de estos

microRNAs en tumores o diseñar sistemas de entrega de microRNAs sintéticos para disminuir la concentración celular de AIB1.

4. Familia de factores de crecimiento tipo insulina (IGF)

4.1 Componentes del sistema IGF

Los factores de crecimiento tipo insulina (IGF) son una familia de potentes polipéptidos mitogénicos con propiedades importantes en crecimiento y diferenciación celular. Tienen un papel central en la progresión del ciclo celular y presentan actividad antiapoptótica. El sistema de señalización IGF juega un papel crítico en el crecimiento y desarrollo de muchos tejidos y regula el crecimiento en general, particularmente el crecimiento prenatal. Comprende varios ligandos (IGF-I e IGF-II), receptores de superficie celular incluyendo el receptor del factor de crecimiento tipo insulina-I (IGF-IR) y el receptor del factor de crecimiento tipo insulina-II (IGF-IIR), y seis proteínas de unión a IGF (IGFBP-1 a IGFBP-6). Los IGFBP afectan a la vida media y biodisponibilidad de los IGF en la circulación y fluidos extracelulares regulando su unión a los receptores. Las acciones biológicas de IGF-I e IGF-II son mediadas principalmente por la activación de IGF-IR. IGF-II también puede unirse a IGF-IIR y al receptor de insulina (IR) (Annunziata, Granata, Ghigo 2011).

4.2 Estructura y función de IGF-IR

IGF-IR está codificado por un gen de 100 Kb que contiene 21 exones localizados en el brazo distal del cromosoma 15. El transcrito de 11 Kb del IGF-IR se traduce en una proteína precursora de 1367 aminoácidos (180 KDa), la cual es entonces procesada para formar una subunidad α de 135 KDa y una subunidad β de 90 KDa. Un receptor maduro es un heterotetrámero compuesto de dos subunidades α y dos subunidades β unidas por puentes disulfuro. El IGF-IR

comparte un 70% de homología estructural con el IR, siendo la región carboxi-terminal la que menos identidad presenta. Las subunidades α se componen de dos dominios homólogos L1 y L2 separados por una región rica en cisteínas. Situadas extracelularmente, son las responsables de la unión al ligando. Las subunidades α constan de un corto segmento transmembrana y un largo segmento intracelular. Se distinguen 3 dominios principales: el dominio yuxtamembrana, donde se unen las proteínas sustrato del receptor de insulina (IRS) y la proteína adaptadora SHC; el dominio catalítico tirosina quinasa que contiene el sitio de autofosforilación; y el dominio carboxi-terminal, que contiene residuos esenciales para las distintas funciones de IGF-IR y donde se unen las proteínas 14-3-3, PI3K y la proteína de unión al receptor del factor de crecimiento 10 (GRB10) (Adams et al. 2000) (**Figura 13**).

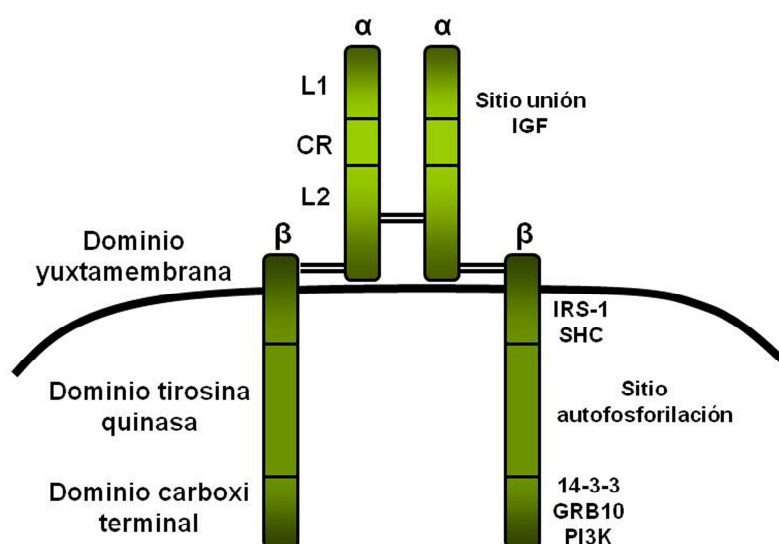


Figura 13. Estructura del IGF-IR. A la izquierda se indican los dominios estructurales. A la derecha, las proteínas que se unen a esas regiones (Surmacz 2000).

La unión del ligando causa autofosforilación en los residuos de tirosina del IGF-IR. Así se crean sitios de unión para las distintas proteínas que componen la señalización por IGF-IR. Este receptor regula varios procesos biológicos como control del tamaño celular, proliferación y supervivencia celular. Esto se consigue activando a través de la fosforilación de las proteínas IRS la cascada de kinasas Ras/MAPK y la ruta PI3K/AKT. Una diana de AKT es p70S6K que activa la expresión de ciclina D1 iniciando la progresión del ciclo celular (Jones et al. 2008). Además, Akt fosforila a BAD (proteína de la familia Bcl-2). La fosforilación de BAD por AKT facilita su secuestro por proteínas adaptadoras 14-3-3 previniendo la apoptosis. IGF-IR también ejerce una función antiapoptótica al inducir la expresión del Twist (Dupont et al. 2001). Otros procesos mediados por IGF-IR son la diferenciación celular, basada en la activación de SHC, y la transformación celular, mediada por NF- κ B y Snail (Kim et al. 2007). Por último, se ha sugerido que IGF-IR también podría regular la esperanza de vida y la resistencia a estrés oxidativo en ratones (Holzenberger et al. 2003) (**Figura 14**).

IGF-IR puede regular por tanto procesos contradictorios como proliferación y diferenciación. Qué rutas serán promovidas dependerá del número de receptores activados en la superficie celular, de la disponibilidad de transductores de señales intracelulares, de la acción de reguladores negativos y del contexto extracelular (presencia de moduladores, de ligando, etc) (Baserga 2000). Es decir, dependiendo de la estirpe celular (factores de transcripción que se estén expresando) y de la intensidad y duración de la señal se producirá una respuesta de proliferación o una de diferenciación. En este sentido, cabe destacar que la expresión del gen IGF-IR está regulada por diversos factores que incluyen hormonas como estrógenos, glucocorticoides, etc (Cardona-Gomez, Chowen, Garcia-Segura 2000; Pandini et al. 2005), factores de transcripción como STAT1 (Shalita-Chesner, Glaser, Werner 2004), factores de crecimiento como IGF-I y bFGF (Hernandez-Sanchez et al. 1997) y genes supresores de tumores como p53, BRCA1 y WT1 (Sarfstein et al. 2006)

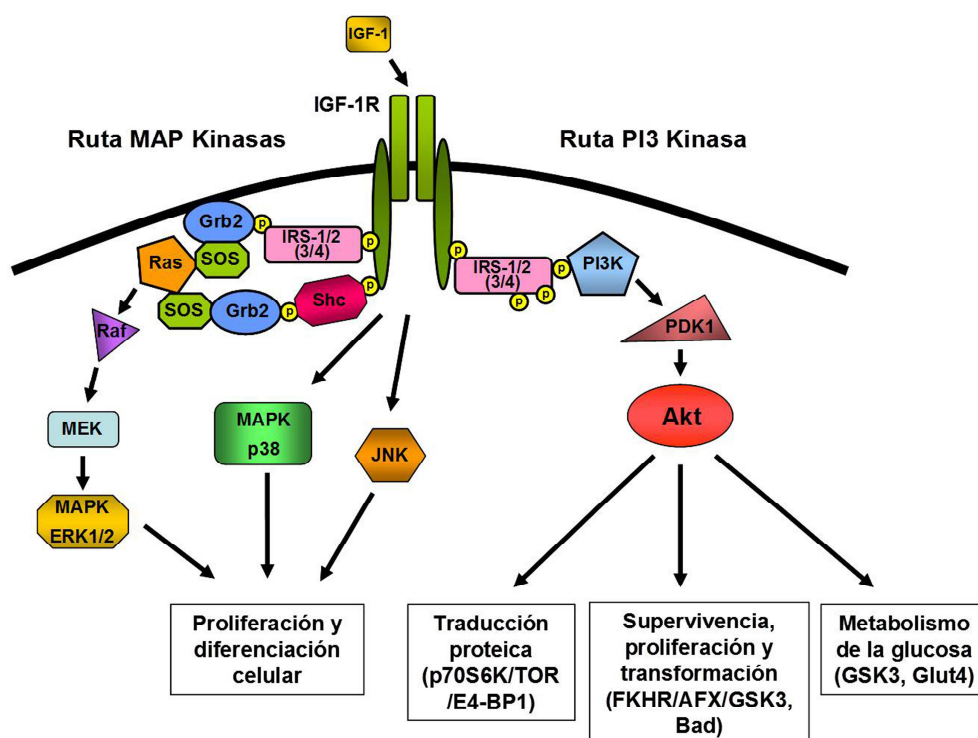


Figura 14. Ruta de transducción de señales a través de IGF-IR. La unión de IGF-I a su receptor activa una cascada de señalización intracelular que regula varios procesos, entre ellos proliferación celular y supervivencia, transformación, traducción proteica y metabolismo de la glucosa.

Recientemente se ha visto que IGF-IR sufre modificaciones postraduccionales como ubiquitinación, defosforilación y sumoilación que controlan su expresión y su función (Girrita et al. 2014). Además de las rutas de señalización conocidas mediadas por la función tirosina quinasa de IGF-IR, recientemente se ha visto que este receptor puede translocarse al núcleo y actuar como factor de transcripción, lo que abre una línea de investigación para desentrañar nuevos mecanismos por los cuales este receptor promovería tumorigénesis (Sarfstein and Werner 2013). Este hecho también es importante a la

hora de volver a considerar a IGF-IR como diana terapéutica. Ha habido intentos previos de atacar la señalización por IGF-IR en células tumorales, reduciendo los niveles de IGF-IR, interfiriendo con la glicosilación y unión a la membrana celular, e incluso aumentando su degradación. También se han probado anticuerpos que bloquean la unión ligando-receptor, los cuales parecían prometedores, pero ninguna de estas aproximaciones ha funcionado completamente. Ahora se cree que este escaso efecto se debe probablemente a que existen otras rutas “no clásicas” por las que IGF-IR ejerce su función de oncogén (Girnita et al. 2014).

4.3 El sistema IGF en la glándula mamaria.

La diferenciación funcional de la glándula mamaria (GM) es un paso crucial en el ciclo reproductivo de los animales. El papel del sistema IGF en la regulación del desarrollo de la GM pubertal y de la lactancia ha sido objeto de estudio durante muchos años (Marshman and Streuli 2002; Rowzee et al. 2008). Además del extenso trabajo en cultivos celulares (Marshman et al. 2003; Strange, Wilkinson, Emerman 2002) y en cultivos de GM in vitro (Richert and Wood 1999), la importancia del sistema IGF en el desarrollo de la GM ha sido demostrado mediante el uso de diversos modelos murinos *knockout* y transgénicos para distintas proteínas del sistema IGF (Hadsell and Bonnette 2000).

En cuanto a los ratones *knockout*, se han empleado distintas técnicas para estudiar el efecto de la ausencia de IGF-I o IGF-IR en la GM. Ratones *knockout* para IGF-I muestran un crecimiento ductal limitado (Kleinberg, Feldman, Ruan 2000). Además, la acción de IGF-I en el desarrollo de la GM es ejercida de modo paracrino y no endocrino, como se demuestra al comparar la GM de ratones *knockout* para IGF-I, cuyo desarrollo ductal está reducido, con la GM de ratones con una delección específica de IGF-I en hígado (que afecta a los niveles circulantes del factor de crecimiento pero no a los niveles tisulares) que presenta morfología normal (Richards et al. 2004). Posteriormente se demostró una función diferencial del IGF-I epitelial y estromal en la GM inactivando el gen *Igf1* específicamente en el epitelio o en el epitelio/estroma mamario, mediante el uso

del sistema Cre-loxP. En este caso también se observó una disminución de la ramificación ductal cuando se eliminó IGF-I en el epitelio mamario (Loladze et al. 2006). Por otro lado, la inactivación de IGF-IR dirigida a la GM también produjo una limitación en el crecimiento ductal al disminuir la proliferación celular en los alveolos terminales. Debido a que los ratones deficientes en IGF-IR mueren nada más nacer (Liu et al. 1993), este estudio se realizó transplantando GM embrionaria procedente de una hembra *knockout* para IGF-IR, a una hembra de 3 semanas de edad (Bonnette and Hadsell 2001).

Por el contrario, los modelos animales que sobreexpresan IGF-I (Hadsell et al. 2005), IGF-II (Bates et al. 1995), IRS-1 e IRS-2 (Dearth et al. 2006) o IGF-IR (Jones et al. 2007) muestran una involución incompleta de la GM lactante y un desarrollo anormal de la GM pubertal, así como una mayor incidencia de tumores mamarios. Estos modelos no sólo apoyan la conclusión de que el sistema IGF es esencial para el desarrollo normal de la GM, sino que sugieren una implicación de este grupo de proteínas en la tumorigénesis.

El papel del sistema IGF en cáncer ha ido cobrando importancia en los últimos años (LeRoith and Roberts 2003; Samani et al. 2007). IGF-IR está sobreexpresado en distintos tipos de cáncer. Además, se han identificado rutas de señalización provenientes de este receptor que afectan a proliferación, adhesión, migración y muerte celular en las células cancerosas. Por el contrario, la supresión de IGF-IR en fibroblastos derivados de embriones de ratón, provocó resistencia a la transformación por la mayoría de oncogenes, indicando que la presencia de IGF-IR es un prerrequisito crítico para la adquisición del fenotipo maligno. En el cáncer de mama en concreto, datos epidemiológicos apoyan la implicación del sistema IGF en la etiología de esta enfermedad. Existe una correlación positiva entre concentraciones de IGF-I circulantes y riesgo relativo de cáncer de mama. Los niveles de IGF-IR se han encontrado elevados hasta 14 veces en tumores de mama primarios comparados con tumores no malignos y esta sobreexpresión de IGF-IR se relaciona con radio-resistencia y recurrencia tumoral. Además, IGF-IR y ER están coexpresados en tumores de mama, siendo la expresión de IGF-IR

estimulada por estrógenos e inhibida por sustancias antiestrogénicas (Surmacz 2000).

5. Relación entre AIB1 y la ruta IGF-I/PI3K/AKT.

Como se ha mencionado anteriormente, AIB1 es capaz de interaccionar y coactivar a receptores esteroideos, a otros receptores nucleares y a diversos factores de transcripción. De este modo, AIB1 funciona como integrador de diferentes rutas de señalización. De entre estas vías, la mejor estudiada es la ruta IGF-I/PI3K/AKT, que como hemos visto está muy relacionada con cáncer de mama y es por ello que en este trabajo nos hemos centrado en ella.

Numerosos estudios con modelos animales, líneas celulares y tumores humanos, han demostrado que AIB1 está implicado en la regulación de los componentes de la ruta IGF-I/PI3K/AKT. La sobreexpresión de AIB1 en la GM de ratones transgénicos de AIB1 produce un aumento en la activación de IGF-IR y AKT. Esta actividad más intensa se debe a que existe una elevación de los niveles de IGF-I circulantes (Tilli et al. 2005; Torres-Arzayus et al. 2004). Por el contrario, la delección de AIB1 en ratones, redujo los niveles de IGF-I y produjo retraso en el crecimiento (Wang et al. 2000; Xu et al. 2000). El estudio con ratones SRC-3^{-/-}/MMTV-v-ras también ha proporcionado evidencias de la oncogénesis mediada por AIB1 a través de IGF-I (Kuang et al. 2004). En estos animales, la deficiencia de AIB1 causa una cierta resistencia a este factor de crecimiento debido a una reducción significativa de IRS-1 e IRS-2. En otro estudio se vio que ratones deficientes en AIB1 y tratados con el carcinógeno DMBA presentaban un desarrollo ductal mamario reducido y un inicio de la detección de tumores palpables retrasado, comparados con ratones control silvestres (WT) (Kuang et al. 2005). En los tumores de los animales WT se detectaron niveles elevados de IRS-1, IRS-2, p-AKT y ciclina D1. En ratones SRC-3^{-/-}, la transcripción de IGFBP3 se redujo, resultando en inestabilidad de IGF-I (Liao et al. 2008). Hay que destacar que aunque tanto ALS como las proteínas IGFBPs forman complejos con IGF-I que mantienen su concentración circulante y su función endocrina (Silha and

Murphy 2005), los niveles bajos de IGFBP3 en los ratones deficientes en AIB1 no correlacionaban con cambios en ALS o en la hormona del crecimiento. Un estudio más reciente ha demostrado que ratones con mutaciones en cuatro de los sitios de fosforilación conservados de AIB1 muestran un peso corporal incrementado, mayor adiposidad y reducida sensibilidad periférica a insulina. Esto es debido a un incremento en la señalización de IGF-I causado por la elevación de los niveles de IGFBP3. Estas mutaciones en AIB1 aumentan la transcripción de IGFBP3 influenciando el crecimiento y el metabolismo. Como consecuencia, estos ratones muestran una elevada tumorigénesis en hígado, provocada probablemente por la elevada señalización de IGF-I (York et al. 2010). Por otra parte, se generaron ratones que expresaban la isoforma truncada de AIB1 (AIB1- Δ 3) bajo el control del promotor de expresión constitutiva CMV. Aunque no se observaron tumores, estos ratones mostraban hiperplasia de la glándula mamaria y niveles aumentados de ciclina D1 e IGF-IR (Tilli et al. 2005).

En biopsias de cánceres de próstata humanos la fuerte expresión de AIB1 correlaciona con una mayor proliferación y niveles elevados de AKT fosforilado (Zhou et al. 2005).

Los resultados con líneas celulares también están de acuerdo con los obtenidos en biopsias y modelos animales. La sobreexpresión de AIB1 produce un aumento en los niveles de componentes de la vía IGF/PI3K/AKT, mientras que su silenciamiento resulta en una disminución de estas proteínas (Yan et al. 2006). Un estudio en células MCF-7 (células de cáncer de mama) encontró una disminución de la formación de colonias sobre agar inducida por IGF-I después del silenciamiento de la expresión de AIB1 (Oh et al. 2004). En estas células, los niveles de expresión de ciclina D1, Bcl-2, ERK2, IGF-IR e IRS1 estaban también reducidos incluso en presencia de antiestrogénicos, sugiriendo que la actividad de AIB1 era requerida para mantener la señalización por AKT de manera independiente de la señalización mediada por ER. En líneas celulares derivadas de cánceres de próstata como LNCaP y PC3, la sobreexpresión de AIB1 también promueve el crecimiento celular al aumentar los niveles de AKT activo (Zhou et al. 2005). Sin embargo, no se observa un mayor aumento de esta quinasa activa

cuando las células son tratadas con andrógenos, indicando de nuevo que AIB1 regula la actividad de AKT de manera independiente de la señalización mediada por esteroides.

En conjunto, estos resultados sugieren que AIB1 es un modulador importante del crecimiento celular mamario y que la señalización por IGF-I es un factor esencial para la hiperplasia y tumorigénesis inducida por este coactivador.



OBJETIVOS

AIB1 es un coactivador de la transcripción de genes implicados en la respuesta fisiológica a hormonas y factores de crecimiento. La sobreexpresión de AIB1 es patológica y hace que se comporte como un oncogén. La sobreexpresión de AIB1 produce un aumento en la expresión de IGF-I que, de una manera auto o paracrina sobreactiva la ruta IGF-IR/PI3K/AKT. Numerosos estudios en líneas celulares y modelos animales demuestran que AIB1 regula los niveles de varios componentes de esta ruta. De este modo, nuestra hipótesis de trabajo es que IGF-I es un mediador muy importante de la oncogénesis promovida por AIB1. Por este motivo nuestro **primer objetivo** en este trabajo ha sido:

- Evaluar el papel que ejerce la señalización de IGF-I en el crecimiento ductal e hiperplasia mamaria promovida por AIB1, mediante la delección de IGF-IR en la glándula mamaria de ratones que sobreexpresan moderadamente AIB1.

Por otra parte, AIB1 se ha relacionado con el fenómeno de invasión y metástasis tumoral, proceso muy estrechamente vinculado con la neovascularización o angiogénesis necesaria para la progresión tumoral. Por ello, un **segundo objetivo** de este trabajo ha sido:

- Evaluar si AIB1 promueve angiogénesis en la glándula mamaria a través de la señalización de VEGF/VEGFR2, comparando ratones silvestres con ratones que sobreexpresan moderadamente AIB1.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Experimentación animal.

La experimentación animal se realizó en el animalario del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF). Los procesos de experimentación utilizados fueron acordes con la legislación española vigente en ese momento relativa al uso y tratamiento de animales de experimentación y organismos modificados genéticamente (RD 1201/2005). Los animales se mantuvieron en jaulas convencionales bajo condiciones controladas de temperatura (23°C), humedad (60%) y ciclos de luz/oscuridad (12 h/12h).

1.1 Modelos murinos.

En este trabajo se han empleado diferentes líneas de ratones que detallamos a continuación:

La línea transgénica *MMTV-AIB1^{+/-}* (tgAIB1) proviene del laboratorio del Dr. Font de Mora y ha sido mantenida en un fondo genético C57BL/6J. En estos ratones se produce una sobreexpresión moderada de la variante humana de AIB1 en el epitelio de la glándula mamaria (GM), dirigida a este tejido por el promotor MMTV-LTR (*Mouse Mammary Tumor Virus Long Terminal Repeat*) (Avivar et al. 2006). La línea transgénica que expresa Cre en la glándula mamaria (*MMTV-Cre^{+/+}*) ha sido adquirida en The Jackson Laboratory. Es la cepa 003553, línea D, fondo genético B6129. La línea que presenta secuencias loxP flanqueando el exón 3 de *Igf1r* (*Igf1r^{loxP/loxP}*) fue generada en el Departamento de Genética Murina y Metabolismo de la Universidad de Colonia (Alemania) y nos fue cedida por el Dr. Brünning. Esta línea ha sido mantenida en un fondo genético C57BL/6J. La recombinación de los sitios loxP por la recombinasa Cre, escinde el exón 3 de *Igf1r*, dando lugar a un mRNA intacto pero con un cambio de pauta de lectura que hace que aparezca un codón de stop en el exón 4 y no se traduzca la proteína (Kloting et al. 2008). La estrategia de cruces seguida entre estos ratones está descrita en el apartado de Resultados.

La línea transgénica que expresa el gen de la luciferasa bajo el control del promotor del gen murino *Vegfr2* (*VEGFR2-Luciferasa^{+/+}*) ha sido adquirida de Xenogen Corporation y se ha mantenido en un fondo genético FVB (Zhang et al. 2004). Estos ratones se cruzaron con nuestros ratones *MMTV-AIB1^{+/-}* para obtener los ratones *MMTV-AIB1^{+/-}/VEGFR2-Luc^{+/-}* (tgAIB1/VEGFR2-Luc) y los ratones usados como control *MMTV-AIB1^{-/-}/VEGFR2-Luc^{+/-}* (WT/VEGFR2-Luc).

1.2 Estudio de angiogénesis *in vivo*.

Se tomaron 3 hembras vírgenes de 4 y 7 semanas de cada uno de los genotipos tgAIB1/VEGFR2-Luc y WT/VEGFR2-Luc. Se anestesiaron los ratones en una unidad de anestesia XGI-8 (Xenogen) que automáticamente inyectaba isoflurano en una pequeña cámara que contenía al animal. Una vez anestesiado, se procedió a afeitar el pelaje de las hembras por la parte ventral con cuidado de no hacer heridas que pudieran interferir con la medida de angiogénesis. Posteriormente se inyectó a cada animal intraperitonealmente el sustrato de la luciferasa, la luciferina (D-Luciferin Firefly Potassium Salt de Xenogen). Los animales fueron pesados para inyectar la cantidad correcta de luciferina, a razón de 150 mg/kg de peso corporal (10 µl/g de peso de una solución preparada a 15 mg/ml en DPBS estéril). La señal emitida por los ratones se midió 15 minutos después de la inyección, colocando a los animales en el analizador biofotónico de imagen IVIS Imaging System 50 (Xenogen), y se realizaron capturas de imagen mientras el animal seguía anestesiado con isoflurano que se le proporcionaba en el interior del sistema IVIS, como muestra la **Figura 15**. El software del sistema proporcionó automáticamente una escala de color superpuesta a la imagen indicando la cantidad de fotones/segundo.

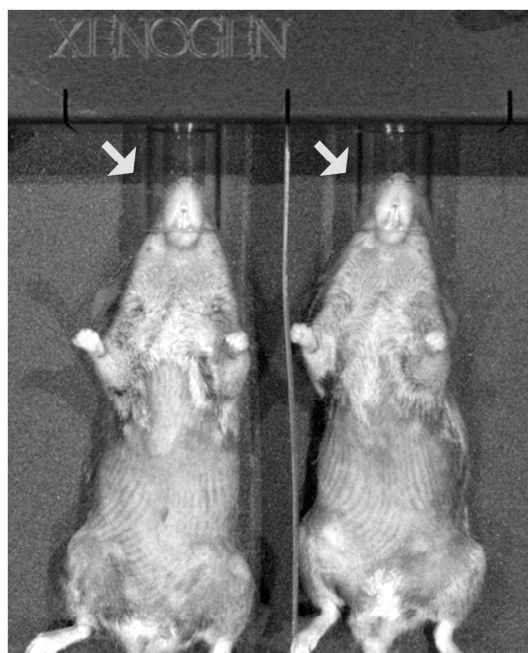


Figura 15. Sistema de anestesia mediante isoflurano en el interior del analizador biofotónico IVIS Imaging System 50 de Xenogen. Los ratones se colocaron con el hocico dentro de la salida del isoflurano durante la captura de las imágenes.

2. Análisis histológico. Tinciones.

2.1 Análisis del ciclo estral mediante frotis vaginal.

Tras el sacrificio de las hembras que iban a ser utilizadas para el análisis morfológico de la glándula mamaria, se procedió a realizar un frotis vaginal introduciendo PBS con una micropipeta en la vagina y succionándolo, repitiendo la operación varias veces. Se colocó la muestra en un portaobjetos y se dejó secar al aire a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó una tinción de hematoxilina/eosina como se describe a continuación:

Etanol 96% - 3 minutos

Etanol 70% - 3 minutos

Agua corriente - 5 minutos

Hematoxilina de Harris (Panreac) - 2 minutos

Agua corriente - 5 minutos

Solución de alcohol ácida - 10 segundos

Agua corriente - 5 minutos

Eosina acuosa (Panreac) - 1.5 minutos

Agua corriente - 5 minutos

Deshidratación en alcoholes crecientes: 70%, 96%, 100%, Xilol - 3 minutos

Colocación cubreobjetos con medio de montaje Entellan (Merck)

Las preparaciones de los frotis vaginales fueron visualizadas y fotografiadas en un microscopio de campo claro Leica DM 1000.

2.2 Tinción de mama completa con carmín aluminio.

Tras el genotipado obtenido con el DNA extraído de la biopsia de cola, se seleccionaron \geq de 6 hembras vírgenes de cada genotipo que se encontraban en la misma fase del ciclo estral. La expresión de Cre y de AIB1 en el epitelio mamario comienza con la pubertad en nuestro modelo animal, aproximadamente a las 3 semanas de vida, coincidiendo con el inicio del desarrollo del árbol ductal de la GM (Avivar et al. 2006; Wagner et al. 2001). En un primer momento, se sacrificaron hembras a las 5 semanas de edad encontrándose mucha variabilidad en cuanto al desarrollo epitelial de la GM dentro de un mismo genotipo. Por este motivo, se concluyó que no era una buena ventana temporal para observar la morfología ductal. Decidimos analizar las mamas a las 7 semanas de edad (pubertad más avanzada) y encontramos que la morfología y tamaño de la GM era homogénea entre hembras coetáneas. A esta edad, los dos transgenes (Cre y AIB1) habían tenido tiempo suficiente de ejercer su efecto en el desarrollo ductal. Adicionalmente, también analizamos las GMs de hembras de 11 semanas de edad (fin de la pubertad), momento en el que los ductos han invadido la totalidad del estroma. De este modo, hembras vírgenes de 7 y 11 semanas de edad fueron sacrificadas mediante dislocación cervical y se les extrajo la GM número 4 (abdominal izquierda). Ésta fue extendida en un portaobjetos y fijada con una solución de ácido acético glacial (Merck) y etanol 70% durante 60 minutos. Tras la

fijación, la GM fue hidratada sumergiéndola en etanol 70% durante 15 minutos y agua desionizada 5 minutos. Posteriormente se tiñó durante 24-48 horas en una solución de carmín (Sigma) y sulfato de aluminio (Sigma). El primero es un colorante que aporta el tono rosado a la preparación y el segundo un mordiente que fija el color. La solución de carmín aluminio se preparó a 100°C durante 20 minutos. Tras filtrarla se le añadió un cristal de timol (Sigma) como conservante y se mantuvo a 4°C en oscuridad. Tras la tinción, se procedió a una deshidratación con alcoholes de graduación creciente: 70%, 95%, 100% y tolueno (Merck) durante 30 minutos cada uno de ellos. Finalmente fue sumergida en metilsalicilato (Merck) para su preservación. Las preparaciones de GM ya teñidas fueron fotografiadas en una lupa Leica. Este tipo de tinción permite obtener una visión global del desarrollo mamario ya que tiñe de un color rosa intenso los ductos mamarios. El metilsalicilato es un agente de conservación muy utilizado porque presenta un índice de refracción muy cercano al del tejido y permite una buena resolución fotográfica.

2.3 Inmunohistoquímica.

La GM número 4 (abdominal izquierda) fue fijada en formalina 10% (Sigma) toda la noche a 4°C. Tras la fijación, las muestras se deshidrataron en un procesador automático de tejidos pasando por baños de concentraciones crecientes de etanol y xilol. A continuación, fueron incluidas en parafina en una estación de inclusión. Posteriormente se realizaron cortes seriados de 4 µm de grosor con un microtomo de rotación. Los cortes fueron adheridos a portaobjetos tratados con poli-lisina (Thermo Scientific). Después se desparafinaron mediante una incubación durante 30 min a 65°C y dos pases por xilol. A continuación se hidrataron las muestras en sucesivos pases por soluciones de etanol en concentraciones decrecientes (100%, 96%, 70% y 50%), finalizando en agua destilada. El desenmascaramiento antigénico de las muestras se llevó a cabo hirviéndolas en tampón citrato (Fluka) durante 10 minutos. Se añadió tampón nuevo y se dejaron enfriar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron

varias veces con agua destilada y se sumergieron durante 10 min en una solución de peróxido de hidrógeno al 3% (agua:H₂O₂) para bloquear la actividad peroxidasa endógena. Tras 3 lavados de 5 minutos con tampón TTBS (tampón TBS con 0.1% de Tween 20 de Sigma), se incubaron las muestras con una solución de TTBS + 10% de suero de cabra (Sigma) durante 60 minutos para reducir el marcaje inespecífico. Después de ese tiempo, se retiró la solución de bloqueo y se incubó con el anticuerpo primario correspondiente diluido en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos utilizados fueron: anti-PCNA (ratón, monoclonal, Santa Cruz) a una dilución 1:200, anti-Cre Rabbit (conejo, policlonal, Novagen a una dilución 1:1000 y anti-IGF-IRβ (conejo, policlonal, Cell Signalling) a una dilución 1:100. También se prepararon controles de anticuerpo primario utilizando suero pre-inmune de ratón o de conejo en lugar de anticuerpo primario, y controles de anticuerpo secundario en los que se omitió la incubación con anticuerpo primario.

Tras la incubación se lavaron las muestras con TTBS para eliminar el exceso de anticuerpo primario y se procedió a la incubación con un polímero conjugado a HRP que reconocía tanto anticuerpos de ratón como de conejo, durante 15 minutos a temperatura ambiente según instrucciones del fabricante (Kit UltraVision de Thermo Scientific). Transcurrido el tiempo, se lavaron las muestras varias veces con TTBS y se añadió el cromógeno DAB del mismo kit. La reacción química se detuvo sumergiendo las muestras en agua destilada cuando se consideró que el tiempo de revelado era el correcto. Por último, se realizó una contratinción suave con hematoxilina, deshidratando las muestras posteriormente y montando los cubreobjetos con Entellan (Merck). Las preparaciones fueron visualizadas y fotografiadas en un microscopio óptico Leica DM 1000 a 40 aumentos.

Para el conteo de células positivas y negativas para PCNA se utilizaron 3 animales por cada genotipo, 10 campos por animal y 100 células/campo. En total unas 1000 células por cada ratón. El conteo se realizó sobre las fotografías de los cortes histológicos con el software Sigma Scan Pro 5.0 (Fereshteh et al. 2008).

2.4 Inmunofluorescencia.

La GM número 4 (abdominal izquierda) fue fijada en formalina 10% (Sigma) toda la noche a 4°C. Tras la fijación, las muestras se deshidrataron en un procesador automático de tejidos pasando por baños de concentraciones crecientes de etanol y xilol. A continuación, fueron incluidas en parafina en una estación de inclusión. Posteriormente se realizaron cortes seriados de 4 µm de grosor con un microtomo de rotación. Los cortes fueron adheridos a portaobjetos tratados con poli-lisina (Thermo Scientific). Después se desparafinaron mediante una incubación durante 30 min a 65°C y dos pases por xilol. A continuación se hidrataron las muestras en sucesivos pases por soluciones de etanol en concentraciones decrecientes (100%, 96%, 70% y 50%), finalizando en agua destilada. El desenmascaramiento antigénico de las muestras se llevó a cabo hirviéndolas en tampón citrato (Fluka) durante 10 minutos. Se añadió tampón nuevo y se dejaron enfriar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron varias veces con agua destilada y se sumergieron durante 10 min en una solución de peróxido de hidrógeno al 3% (agua:H₂O₂) para bloquear la actividad peroxidasa endógena. Las muestras se lavaron con tampón PBS durante 5 minutos y se incubaron sumergidas en una solución de glicina 150 mM (Sigma) durante 15 minutos para eliminar la autofluorescencia del tejido. Posteriormente se lavaron las muestras 2 veces con PBS y se les añadió la solución de bloqueo compuesta por 5% de leche y 5% de suero de cabra (Sigma) diluido en PBS durante 60 minutos para reducir el marcaje inespecífico. Después de ese tiempo, se retiró la solución de bloqueo y se incubó con el anticuerpo primario correspondiente diluido en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos utilizados fueron: anti-IGF1Rβ (conejo, policlonal, Cell Signaling) diluido 1:100 y anti-Cre (ratón, monoclonal, Covance) diluido 1:100. También se prepararon controles de anticuerpo primario utilizando suero pre-inmune de ratón o de conejo en lugar de anticuerpo primario, y controles de anticuerpo secundario en los que se omitió la incubación con anticuerpo primario. Tras la incubación se lavaron las muestras con tampón 0.2% Tritón X-100 en PBS para eliminar el exceso de anticuerpo

primario. Se volvió a añadir solución de bloqueo durante 15 minutos. Después se lavaron las muestras con tampón de lavado 0.2% Tritón/PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario diluido en 0.2% tritón y 5% de leche en PBS, durante 60 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. El anticuerpo secundario utilizado fue anti-Ratón o anti-Conejo marcado con el fluoróforo Cy3 y diluido 1:400 (Jackson ImmunoResearch). Las muestras se lavaron con 0.2% Tritón/PBS varias veces para finalizar con un lavado con agua destilada. Posteriormente se incubaron con DAPI (tinción de contraste) diluido 1:1000 en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron con agua destilada y se montaron con el medio de montaje Mowiol (Calbiochem). Las preparaciones fueron visualizadas en un microscopio láser confocal Leica TCS-SP2.

3. Análisis morfométrico de la glándula mamaria.

El análisis de los distintos parámetros que indicaban el desarrollo de los ductos de la glándula mamaria, se realizó con las imágenes obtenidas de las mamas teñidas con carmín aluminio (tinción de mama completa).

3.1 Penetración ductal.

El análisis de la penetración ductal se realizó midiendo la distancia en milímetros (mm) desde el centro del nódulo linfático hasta el final del ducto más largo (Lu et al. 2008). Se utilizaron entre 4 y 6 ratones de cada genotipo. Las medidas se realizaron con el software Sigma Scan Pro 5.0.

3.2 Penetración ductal relativa.

El análisis de la penetración ductal relativa se realizó midiendo la distancia en mm desde el centro del nódulo linfático hasta el final del ducto más largo y dividiendo este dato por la longitud en mm desde el centro del nódulo linfático

hasta el final del estroma (hacia la región dorsal) (Avivar et al. 2006). Se utilizaron entre 4 y 6 ratones de cada genotipo. Las medidas se realizaron con el software Sigma Scan Pro 5.0.

3.3 Porcentaje de ocupación epitelio/estroma.

El análisis de la ocupación del porcentaje del área ocupada por el epitelio frente al área total del estroma se realizó con el software ImageJ 1.42q. Se utilizaron entre 4 y 6 ratones de cada genotipo. En primer lugar la imagen de la tinción de carmín aluminio se transformó a 8 bits. Se seleccionó el área ocupada por el estroma o *fat pad* y se midió en píxeles. Luego se procesó la imagen con un detector de bordes y se aplicó un nivel de color umbral que permitió seleccionar el árbol ductal. Entonces se midió el área en píxeles de este árbol ductal. El porcentaje de ocupación epitelio/estroma se calculó dividiendo el área de los ductos por el área total del estroma (Bonnette and Hadsell 2001; Loladze et al. 2006).

3.4 Ramificación ductal.

La cuantificación del número de ramificaciones laterales ductales por mm^2 se realizó con el software Sigma Scan Pro 5.0. Se utilizaron 3 ratones de cada genotipo. Las imágenes de la tinción de mama completa se combinaron con una capa de imagen superpuesta consistente en una gradilla de 3 x 3 mm. El número de puntos de ramificación se contó en campos de la gradilla que estuvieran repletos de ductos. Se contaron 2 campos/mama de cada genotipo en las imágenes de 7 semanas de edad y 3 campos/mama en las de 11 semanas. Luego se calculó el número medio de puntos de ramificación por mm^2 (Richards et al. 2004).

4. Cultivos celulares.

La manipulación de las células se llevó a cabo en condiciones de esterilidad en una cabina de flujo laminar tipo 2A de Telstar. Las placas de cultivo y pipetas de plástico estériles utilizadas eran de Corning. Las líneas celulares fueron mantenidas en una estufa de 37°C con una atmósfera saturada de humedad compuesta por un 5% de CO₂ y un 95% de humedad relativa (Thermo Electron Corporation).

Las células se subcultivaron regularmente para mantener un crecimiento exponencial. El mantenimiento de líneas celulares a largo plazo se realizó por criopreservación. El precipitado de células obtenido de un cultivo en crecimiento exponencial se resuspendió en FBS con un 12% de DMSO (Sigma) y se guardó en criotubos estériles (Corning) en un contenedor de poliestireno de Nalgene a -80°C con isopropanol para que la temperatura disminuyera paulatinamente, y así evitar la formación de cristales que dañaran las células.

Para contar células se utilizaron la cámara de Neubauer o hemocitómetro y un microscopio óptico invertido (Leica DMIL). La cantidad requerida de células se sembró en placas de 6 cm de diámetro o en placas de 6 o 48 pocillos, según cada experimento.

4.1 Línea celular humana HMEC.

La línea HMEC compuesta por células epiteliales de mama humanas (no tumorales) fue adquirida en la ATCC (*American Type Culture Collection*). Las células se cultivaron en el medio de cultivo específico MEM (Clonetics) suplementado con MEGM (Clonetics). Los cultivos celulares se mantuvieron en crecimiento exponencial evitando que llegaran a confluencia. Antes de alcanzar la confluencia, las células se despegaron de la superficie de la placa de cultivo mediante tratamiento con Tripsina-EDTA (Invitrogen) y se dividieron adecuadamente en nuevas placas de cultivo. Todos los experimentos fueron realizados con cultivos de no más de 20 pases.

4.2 Cultivos primarios de glándula mamaria de ratón (MMEC).

La obtención de cultivos primarios de mama de ratón se realizó partiendo de una de las glándulas abdominales y las dos inguinales de hembras vírgenes de 12-13 semanas de edad. El tejido se extrajo en condiciones lo más asépticas posibles tras el sacrificio de las hembras. Para ello, las hembras se rociaron con etanol 70% por la parte ventral, lo que además de esterilizar facilitó que no se desprendiera el pelo durante la disección, que se realizó en el interior de la cabina de flujo laminar. Las mamas se fueron depositando en placas de 6 pocillos con medio DMEM/F12 (Gibco) sin suero bovino fetal (FBS). Finalizada la extirpación de todos los ratones que se requerían, se procedió al troceo y trituración del tejido con ayuda de dos hojas de bisturí, sobre una tabla de corte de teflón o en su defecto polietileno (sobre este tipo de tabla no se reseca el tejido y el tiempo y el esfuerzo del troceo se reducen considerablemente). El tejido fue desmenuzado concienzudamente hasta obtener trocitos de menos de 1mm^2 (debe quedar como una papilla). Este era un paso crítico ya que si no se troceaba bien el tejido la digestión posterior era incompleta y no se liberaban organoides. Se preparó el medio de digestión que consistía en 1 mg/ml de collagenasa A (Roche) disuelta en DMEM/F12 sin FBS y dejada reposar desde el inicio del sacrificio a 37°C. El volumen en que se resuspendieron las mamas para la digestión fue aproximadamente de 10 ml/g de tejido. La papilla obtenida se colocó en un tubo cónico de 50 ml con el volumen de medio de digestión adecuado y se depositaron los tubos inclinados en un agitador a 37°C a 150 rpm, con una inclinación tal que los trozos se golpearan contra el fondo, durante 45 minutos (hasta que no se detectaron trozos visibles). Pasado el tiempo se añadió medio DMEM/F12 sin FBS hasta 10 ml y se traspasó a un tubo cónico de 15 ml. Se pipeteó con una micropipeta P1000 (Gilson) varias veces para disgregar los trozos que pudieran quedar. Tras esto, se centrifugaron los tubos 5 minutos a 900 rpm. Se obtuvo un pellet, y por arriba una capa de grasa en la que quedaban retenidos organoides (cuanto mejor la digestión menor esta capa). La capa grasosa se recogió y se puso en otro tubo cónico, se pipeteó bien con una micropipeta P1000 para liberar

los organoides. Se eliminó el sobrenadante que estaba en el primer tubo y se resuspendió el pellet en 2 ml de DMEM/F12 sin FBS. Se pipeteó bien con una micropipeta P1000. Posteriormente se juntaron los dos tubos en uno y se centrifugó 5 minutos a 900 rpm. Se eliminó el sobrenadante observando que la capa grasosa era más fina que antes. El pellet se resuspendió en 1ml de Red Blood Lysing Buffer (Sigma) para eliminar eritrocitos, agitando suavemente durante 2 minutos, tras lo cual se añadieron 8 ml de PBS para lavar. Se centrifugó el tubo 5 minutos a 900 rpm, se eliminó el sobrenadante observando que el pellet era más pequeño y menos rojo. Se repitió este paso pero dejando el Red Blood Lysing Buffer solo durante 1 minuto, tras lo cual se centrifugó 5 minutos a 900 rpm. El pellet resultante se resuspendió en medio completo fresco compuesto por: DMEM/F12 con 5% de FBS y suplementado con 5 µg/ml de insulina (Sigma), 10 µg/ml de hidrocortisona (Sigma), 10 ng/ml de EGF (factor de crecimiento epidérmico) murino (Sigma), 5 µg/ml de ácido linoleico (Sigma), gentamicina 50 µg/ml (Sigma) y 100 U/ml de Penicilina/Estreptomina (Gibco), y las células se sembraron en placas de 6 o 10 cm según el pellet observado. Se dejó reposar durante 1 hora a 37°C para que se pegaran los fibroblastos. Pasado este tiempo, se recogió todo el medio y se depositó en nuevas placas. Las células se dejaron crecer durante 2 días. Entonces se recogió el medio de cada placa y se pasó a otra placa nueva por si quedaban organoides aún sin adherirse, previa centrifugación y cambio de medio fresco. A la placa original se le añadió medio fresco.

Para subdividir los cultivos se utilizó dispasa (Roche) a una concentración de 2.4 U/ml durante 10 minutos a 37°C. Se retiró la enzima, se lavó con PBS la placa y se volvió a añadir dispasa durante 30 minutos. Se recogieron las células y tras centrifugación a 900 rpm durante 5 minutos, se volvieron a sembrar en las placas adecuadas con medio completo.

5. Sobreexpresión y silenciamiento de genes.

Las células HMEC se sembraron el día previo al experimento en placas de 6 cm, de 6 pocillos o de 48 pocillos, según el experimento. Al día siguiente debían estar al 50% de confluencia. Se transfectaron con siRNA Stealth (Invitrogen) diseñado para silenciar IGF-IR o con siRNA control para compensar. Se utilizó una concentración de siRNA total de 40 nM y la transfección se realizó con Lipofectamina 2000 (Invitrogen) en una proporción de 50 pmol RNA/2.5 µl lipofectamina, según indicaciones del fabricante. Durante la transfección el medio utilizado fue OptiMEM (Gibco). A las 24 horas se cambió el medio, añadiendo el medio específico para HMECs. Entonces se procedió a la infección con adenovirus Ad5 para sobreexpresar AIB1 humano. Los adenovirus se generaron en el servicio del Centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica de la Universidad Autónoma de Barcelona. Se utilizaron 50 MOI de adenovirus (50 partículas víricas por célula). Transcurridas 48 horas desde la infección, las células se despegaron y se utilizaron a conveniencia según el experimento.

6. Determinación del ciclo celular y de la proliferación.

6.1 Citometría de flujo en MMECs.

El análisis del ciclo celular se realizó por determinación del contenido de DNA de las células mediante tinción con yoduro de propidio, un fluorocromo que se intercala en el DNA y RNA de doble cadena. Los cultivos de MMECs de los distintos genotipos se trataron con dispasa (Roche) a una concentración de 2.4 U/ml durante 10 minutos a 37°C. Se retiró la enzima, se lavó con PBS la placa y se volvió a añadir dispasa durante 30 minutos. Se lavaron las células con PBS y se añadió TrypLE Express (Gibco), una enzima disociativa de origen no animal más suave con las células que la tripsina. Cuando las células se despegaron se recogieron en un tubo cónico y se centrifugaron a 900 rpm durante 5 minutos. Se

eliminó el sobrenadante y se añadió Accumax incubándose a 37°C durante 10 minutos. Las células se lavaron con medio DMEM/F12 y se centrifugaron a 900 rpm durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se añadió 2 ml de DMEM/F12 con 200 µl de DNasa I (1 mg/ml) durante unos minutos. Las células se lavaron con DMEM/F12 y se centrifugaron a 900 rpm durante 5 minutos. El pellet obtenido se resuspendió en 1 ml de PBS y se filtró a través de un filtro de 30 µm depositando el contenido en un tubo de citómetro. Se contó el número de células en una cámara de Neubauer y se repartieron en 3 tubos de citómetro. Se centrifugaron a 400 x g durante 5 minutos. Se eliminó el PBS y el pellet celular se resuspendió en etanol frío al 70% añadiéndolo gota a gota en un vórtex para permitir la fijación y la permeabilización de las células. Unas 16 horas después, se eliminó el etanol mediante dos lavados con PBS, y las células se tiñeron con yoduro de propidio 5 µg/ml (Sigma) y RNasa 1 mg/ml (Roche) a 4°C durante 16 horas en ligera agitación y en oscuridad. Una vez teñidas, las células se analizaron en un citómetro Cytomics FC500 (Beckam Coulter). Se prepararon triplicados de cada cultivo y se adquirieron 20.000 células en cada uno. Los resultados obtenidos se analizaron mediante el programa WinMDI 2.8.

6.2 Citometría de flujo en HMECs.

Tras el experimento de transfección/infección, las células se lavaron dos veces con PBS recogiendo el medio inicial y el de los lavados en un tubo cónico. Se añadió TrypLE Express (Gibco), las células se resuspendieron en PBS y se centrifugaron a 200 x g durante 5 minutos. El pellet celular se resuspendió en PBS y se filtró a través de un filtro de 40 µm (Becton Dickinson) colocado en un tubo cónico de 50 ml (Falcon). El PBS con células ya filtradas se trasvasó a un tubo de citómetro y se centrifugó a 300 x g durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante hasta que quedaron 2 ml de volumen. Se contó el número de células en una cámara de Neubauer y se repartieron en 3 tubos de citómetro. Se centrifugaron de nuevo a 300 x g durante 5 minutos. Se eliminó el PBS y el pellet obtenido se resuspendió en etanol frío al 70% añadiéndolo gota a gota en un vórtex para

permitir la fijación y la permeabilización de las células. Unas 16 horas después, se eliminó el etanol mediante dos lavados con PBS, y las células se tiñeron con yoduro de propidio 5 µg/ml (Sigma) y RNasa 1 mg/ml (Roche) a 4°C durante 16 horas en ligera agitación y en oscuridad. Una vez teñidas, las células se analizaron en un citómetro Cytomics FC500 (Beckam Coulter). Se prepararon triplicados de cada cultivo y se adquirieron 20.000 células en cada uno. Los resultados obtenidos se analizaron mediante el programa WinMDI 2.8.

6.3 Ensayo de proliferación celular MTT.

Para determinar la proliferación/supervivencia celular se utilizó un ensayo colorimétrico con MTT (tiazolil azul formazán) de Sigma. El reactivo MTT, soluble y de color amarillo, es captado por las células vivas mediante endocitosis donde es reducido a formazán (sal insoluble, color púrpura) por las enzimas mitocondriales, y esto solo ocurre en células viables presentes en el cultivo. Tras solubilizar los cristales de formazán es posible medir su intensidad de fluorescencia a 570 nm y determinar el porcentaje de viabilidad celular. Las células HMEC se sembraron en placas de 48 pocillos con triplicados para cada tratamiento y se transfectaron con siRNA para IGF-IR e infectaron con adenovirus de AIB1. A las 72 horas se añadió una solución MTT a 5 mg/ml en proporción equivalente al 10% del volumen del pocillo (20 µl), previamente se dejaron todos los pocillos con 200 µl de medio. Se dejaron incubar las células 4-5 horas a 37°C. Tras este periodo, se succionó el MTT y se añadió DMSO (100 µl) dejando las placas en agitación para que se mezclara bien el formazán con el DMSO. Tras la incubación, se midió la absorbancia a 570 nm en el lector de placas VICTOR 2 V 1420 Multilabel HTS counter (Wallac). Se analizaron los datos de absorbancia obtenidos expresando el resultado como porcentaje de proliferación respecto a 100% (células HMEC control).

7. Técnicas con DNA.

7.1 Extracción de DNA.

La extracción del DNA genómico se realizó partiendo de un fragmento de cola seccionada a los ratones (< 0.5 cm) el día del destete, o de un fragmento de glándula mamaria. Se digirió el tejido en tampón de lisis (50 mM Tris, pH 7.5, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.2% SDS) suplementado con 20 mg/ml de Proteinasa K a 55°C durante 8-24 horas, y posteriormente se extrajo el DNA por el método del fenol cloroformo.

7.2 Genotipado de los ratones.

El genotipado de los ratones se realizó mediante PCR para los genes de interés: *AIB1*, *Cre*, *Igf1r*. Los cebadores para *Igf1r* están diseñados de modo que detecten la presencia o ausencia de secuencias loxP en este gen (Kloting et al. 2008). En el caso de *AIB1* y *Cre* el resultado esperado era una banda si el ratón era transgénico o ninguna si no lo era. Para evitar posibles confusiones debidas a falsos negativos, se añadieron a la reacción cebadores para amplificar un gen endógeno que sirviera como control interno y que pudiera ser amplificado con el mismo programa de termociclado. En el caso de *AIB1* utilizamos cebadores para *Grf1*. En el caso de *Cre*, los cebadores control amplifican una región del cromosoma 14.

Secuencias de los cebadores empleados:

AIB1: 5' GGCCCCGGCCCCCAAGCTTG 3'

5' CGTGAATCACTGGCCAGTGGATCC 3'

Grf1: 5' AGTTGCTGAAGGGAGGAGGGTAGCGGC 3'

5' TGACCAGGCCGTCCTCTGTGTAATTGG 3'

Cre: 5' CTGATCTGAGCTCTGAGTG 3'

5' GTGAAACAGCATTGCTGTCACTT 3'

Cr 14: 5' CAAATGTTGCTTGTCTGGTG 3'

5' GTCAGTCGAGTGCACAGTTT 3'

Igf1r: 5' TCCCTCAGGCTTCATCCGCAA 3'

5' CTTCAGCTTTGCAGGTGCACG 3'

Tanto en la secuencia de los cebadores como en el programa de termociclado se siguieron las recomendaciones de The Jackson Laboratory para amplificar *Cre* y del Dr. Brünning para detectar secuencias loxP en *Igf1r*. Posteriormente los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. El tampón empleado para la electroforesis fue TAE (Tris-HCl 40 mM, ácido acético 30 mM y EDTA 1 mM, pH 7.6) y el tampón de carga Blue/Orange 6X Loading Dye (Promega). Los geles de agarosa se prepararon con TAE conteniendo bromuro de etidio 0.5 µg/ml (Invitrogen). Los marcadores de peso molecular utilizados fueron Lambda DNA/Hind III (Invitrogen) y phiX174/Hae III (Promega). El DNA resuelto en el gel de agarosa se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta (Bio-Rad). Las bandas observadas fueron las siguientes:

GEN	BANDA OBTENIDA
<i>AIB1</i>	340 pb; 800 pb = Control interno
<i>Cre</i>	550 pb; 200 pb = Control interno
<i>Igf1r</i>	300 pb = alelo silvestre; 350 pb = alelo loxP

7.3 Comprobación de la delección en *Igf1r* en DNA genómico.

La comprobación de la delección del exón 3 de *Igf1r* tanto en DNA de cola como de glándula mamaria se realizó siguiendo de nuevo las recomendaciones del Dr.Brünning, utilizando cebadores que hibridaban en el intrón anterior a la zona a deleccionar (exón 3) y en el interior del exón 3, de modo que permitían detectar si se había producido la recombinación inducida por *Cre*. La secuencia de los cebadores empleados es la siguiente:

5' TTATGCCTCCTCTCTTCATC 3'

5' CTTCAGCTTTGCAGGTGCACG 3'

Esta reacción de PCR estaba específicamente diseñada para detectar tres tipos de alelos (Cadoret et al. 2005; Loladze et al. 2006): el alelo silvestre (1100 pb), el alelo con secuencias loxP (1300 pb) y el alelo recombinado al que le falta el exón 3, *Igf1*^{ΔExón 3} (495 pb).

Tras la PCR los fragmentos amplificados se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, tal y como se ha explicado en el apartado anterior.

8. Técnicas con RNA.

8.1 Extracción de RNA.

El RNA del cultivo de MMECs se extrajo lavando dos veces las placas de cultivo con PBS. Sobre la superficie de la placa de cultivo se añadió el volumen de TRIzol (Invitrogen) recomendado por el fabricante según el tamaño de la placa. Tras homogenizar la muestra con la pipeta, se transfirió a un tubo de 1.5 ml (Eppendorf), y se añadieron 100 µl de cloroformo (Merck). La mezcla se agitó vigorosamente durante 30 segundos y se dejó reposar 5 minutos antes de ser centrifugada a 4°C durante 15 minutos a 14.000 rpm con objeto de separar la fase orgánica de la fase acuosa. El RNA se precipitó de la fase acuosa mediante la adición de 250 µl de isopropanol (Merck), dejándolo reposar 10 minutos a temperatura ambiente y centrifugando durante 10 minutos a 14.000 rpm. El precipitado se lavó con etanol 70%, se resuspendió en tampón de DNasa y se trató con 20 unidades de DNasa I (Takara) durante 30 minutos a 37°C para eliminar las posibles trazas de DNA. Finalmente, el RNA se purificó con el sistema RNeasy (Qiagen), se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo

Scientific), almacenándose a -80°C hasta el momento de su uso. Todo el material utilizado para la manipulación de RNA estaba libre de RNasas.

La extracción de RNA de tejido se realizó de modo similar a la de cultivo pero triturando en hielo una glándula mamaria completa en 1 ml de TRIzol (Invitrogen) mediante un homogeneizador Ultra-Turrax. Posteriormente se continuó con el protocolo tal y como se ha descrito.

8.2 RT-PCR semicuantitativa.

La transcripción inversa de los RNAs aislados se realizó mediante el sistema SuperScript First-Strand Synthesis (Invitrogen), excepto para *Igf1r*. Se preparó una mezcla con 1.5 µg de RNA total, 1 µl de oligo(dT) 0.5 µg/µl, 1 µl de dNTPs 10 mM y agua tratada DEPC (Ambion) hasta 10 µl de volumen final. El RNA se desnaturalizó durante 5 minutos a 65°C e inmediatamente después se enfrió en hielo durante 1 minuto. A continuación, se añadieron 2 µl de tampón de reacción 10X, 4 µl de MgCl₂, 2 µl de DTT y 1 µl de RNasa Out, y la muestra se incubó 2 minutos a 42°C. Seguidamente, se adicionó la polimerasa SuperScript II y se incubó a 42°C durante 50 minutos más. Las reacciones se terminaron a 70°C durante 15 minutos. La muestra se trató con RNasa H a 37°C durante 20 minutos con objeto de eliminar cualquier resto de RNA. Todo el programa se realizó en un termociclador Eppendorf. Los cDNAs obtenidos se guardaron a -80°C hasta su utilización. El análisis de la expresión de genes se realizó por PCR semicuantitativa a partir de los cDNAs obtenidos, empleando cebadores específicos para cada gen:

Gapdh: 5' ACCACAGTCCATGCCATCAC 3'

5' TCCACCACCCTGTTGCTGTA 3'

Alb1: 5' GGCCAGTGATTACGAAAACG 3'

5' ACTTTCCTGCTCCCGTCTCC 3'

Cre: 5' GACCAGGTTTCGTTCACTCATGG 3'

5' AAATCCATCGCTCGACCAGTTT 3'

Vegf: 5' GACACGGTGGTGGGAAGAAG 3'

5' GTCCTGCCCCATTGCTCTG 3'

Vegfr1: 5' GTCTGTGTGCTTAGGTCGTG 3'

5' CTGCAGGCTGTCTCAGTGG 3'

Vegfr2: 5' GCCTGTCAGGAAACGCAAAG 3'

5' CCTGAGAGATGAGGAAGGAG 3'

Igf1r: 5' AGGAGAAGCCCATGTGTGAG 3'

5' CAGGAAGGACAAGGAGACCA 3'

En el caso de la comprobación en RNA de MMECs de la delección del exón 3 en *Igf1r* se utilizó el kit SuperScript One-Step RT-PCR System (Invitrogen), que genera en una misma reacción cDNA y DNA, para posteriormente visualizar los fragmentos de DNA obtenidos directamente en un gel de agarosa. En este caso, los cebadores se diseñaron en el exón 2 y 5 de *Igf1r*, de modo que se podían detectar dos tipos de bandas en el gel: una de 650 pb perteneciente al RNA íntegro y una de 338 pb que correspondía al RNA de *Igf1r* que había perdido el exón 3.

En el experimento con RNA de MMECs se comprobó la expresión de los transgenes *AIB1* y *Cre* y la delección en *Igf1r*. *Gapdh* se usó como comprobación de la integridad del RNA.

En el experimento con RNA de los genes *Vegf*, *Vegfr1* y *Vegfr2* se realizó una cuantificación de la expresión semicuantitativa. Las reacciones de amplificación se prepararon por triplicado y las intensidades de las bandas se cuantificaron mediante el programa Quantity One (Bio-Rad) y se normalizaron a los niveles de *Gapdh* como gen de control interno.

8.3 RT-PCR en tiempo real.

La transcripción inversa de los RNAs aislados se realizó mediante el sistema SuperScript First-Strand Synthesis (Invitrogen) tal y como se ha descrito. Con el cDNA obtenido se preparó una PCR en tiempo real con los mismos cebadores

indicados arriba para *Vegf*, *Vegfr1*, *Vegfr2* y *Gapdh*, 300 ng de cDNA y el reactivo SYBR green supermix (Bio-Rad). Cada muestra se preparó por triplicado en el termociclador de tiempo real Lightcycler 480 (Roche). Los valores obtenidos se analizaron con el software del aparato, relativizando a los valores de GAPDH.

9. Técnicas con proteínas.

9.1 Extracción de proteínas.

La extracción de proteínas de los cultivos de HMECs y de MMECs se preparó lavando las placas de cultivo cuidadosamente con PBS frío y manteniéndolas sobre hielo, recogiendo exhaustivamente el último lavado. Posteriormente se realizó la lisis celular en medio hipertónico con el tampón comercial 10x Cell Lysis (Cell Signaling) suplementado con cloruro sódico 300 mM (Sigma), fluoruro sódico 1 mM (Sigma), AEBSF 1 mM (Roche) y un complejo inhibidor de proteasas (Roche). Se raspó la superficie de la placa con una espátula (Corning) en presencia del tampón de lisis, y la mezcla se transfirió a un tubo de 1.5 ml (Eppendorf) previamente enfriado en hielo. Los lisados se mantuvieron en hielo durante 15 minutos agitándose vigorosamente en un vórtex (VWR International) durante 10 segundos a intervalos de 2-3 minutos. A continuación se centrifugó la suspensión a 16000 x g durante 15 minutos a 4°C. Se descartó el precipitado y se obtuvieron los extractos de proteínas en el sobrenadante. Seguidamente se cuantificó la cantidad de proteína presente en cada lisado. Las cuantificaciones se realizaron por métodos fotométricos a una longitud de onda de 595 nm empleando la técnica de Bradford (Bio-Rad). Como blanco se empleó el tampón de lisis que se había usado previamente. La concentración proteica fue determinada mediante extrapolación de los valores de absorbancia obtenidos por las muestras frente a los valores de una recta patrón con concentraciones conocidas de BSA (Sigma).

La extracción de proteínas de glándula mamaria se realizó de distinta forma teniendo en cuenta que los lisados proteicos se iban a utilizar para medidas de

actividad luciferasa. Se preparó tampón de lisis PLB 1X (Passive Lysis Buffer de Promega, 5X) con un complejo inhibidor de proteasas (Roche). Las glándulas mamarias extirpadas a las hembras se pesaron y se trituraron en hielo en aproximadamente 10 volúmenes de tampón PLB con un homogeneizador (ULTRA-TURRAX) en un tubo de 1.5 ml (Eppendorf). Los lisados se mantuvieron en hielo durante 30 minutos, agitando con vórtex cada 5 minutos. Posteriormente se centrifugaron a 16000 x g durante 15 minutos a 4°C para eliminar las partículas insolubles. Se recogió el sobrenadante con una jeringa de insulina para evitar recoger la grasa adherida a la pared del tubo. Los lisados se volvieron a centrifugar a 16000 x g durante 15 minutos a 4°C. Se recogió el sobrenadante con una jeringa de insulina y se paso a otro tubo. Por último, se midió la concentración proteica mediante el método de Bradford.

9.2 Inmunotransferencia de proteínas.

La separación de proteínas fue llevada a cabo por electroforesis en minigeles verticales de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE), según el método de Laemmli. Estos geles verticales se componían de dos regiones: el gel empaquetador o de apilamiento en la parte superior (Tris-HCl 250 mM, SDS 7 mM, 4% de acrilamida:bisacrilamida, pH 6.8 Bio-Rad) y el gel de resolución en la parte inferior (Tris-HCl 375 mM, SDS 3.5 mM, pH 8.8), cuyo tamaño de poro variaba según el tamaño de la proteína a analizar y el porcentaje de acrilamida añadido (entre 7.5 y 15%). Para polimerizarlos se utilizaron persulfato amónico (Sigma) y TEMED (Merck). Antes de proceder a su separación, las muestras proteicas se desnaturalizaron durante 5 minutos a 95°C en presencia de solución desnaturalizadora de Laemmli 1X (glicerol 10%, SDS 1%, Tris-HCl 50 mM, pH 6.8, azul de bromofenol 0.0625% Merck y β -mercaptoetanol 2.5% Merck). Se cargó un total de 50 μ g de proteína por calle. La electroforesis se realizó a voltaje constante (100V) en tampón Tris-HCl 25 mM, glicina 200 mM y SDS al 0.05%. Los tanques, sistemas de preparación de geles y fuentes de alimentación fueron obtenidos de Bio-Rad. Para poder detectar proteínas específicas, los geles de poliacrilamida

resueltos por SDS-PAGE fueron transferidos a membrana de fluoruro de polivinilideno (Millipore) en tampón de transferencia (Tris-HCl 25 mM, pH 8.3, glicina 192 mM y metanol al 20%) durante toda la noche a 200 mA y a 4°C. Finalizada la transferencia, las membranas se incubaron durante al menos 60 minutos en BSA al 5% en el tampón de lavado TTBS (Tris-HCl 25 mM, pH 8, NaCl 150 mM, KCl 2.5 mM y 0.1% de Tween 20) para bloquear las uniones inespecíficas. Posteriormente, las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente diluido en TTBS y BSA al 3%. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti-IGF1R β (conejo, policlonal, Cell Signalling) diluido 1:1000, anti-AIB1 (ratón, monoclonal, BD) diluido 1:500, anti-Cre (conejo, policlonal, Novagen) diluido 1:10000, anti-Actina β (ratón, monoclonal, Sigma) diluido 1:10000.

Las membranas se lavaron tres veces en TTBS y se incubaron 60 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario apropiado: anti-Ratón o anti-Conejo unidos a HRP diluidos 1:5000 (GE Healthcare). Las proteínas se visualizaron con el sistema quimioluminiscente ECL de Santa Cruz o con el sistema más sensible ECL Plus de GE Healthcare.

10. Medida de actividad transcripcional: gen reportero luciferasa.

La activación del promotor de VEGFR2 en los lisados obtenidos de las glándulas mamarias de los ratones VEGFR2-Luciferasa, se midió por quimioluminiscencia usando un luminómetro (Berthold Detection Systems). Se transfirieron 50 μ l del lisado correspondiente a cada animal en 3 tubos diferentes para tomar la medida por triplicado y el lisado se dejó atemperar. Al introducir los tubos en el luminómetro, el aparato inyectó automáticamente a cada tubo 100 μ l del sustrato de la luciferasa (luciferina de Promega) y se midió la luz emitida por la reacción catalizada por la luciferasa.

11. Análisis estadístico de datos.

Los cálculos de las medias y desviaciones estándar de los datos fueron realizados mediante Excel, así como la construcción de las gráficas. El análisis de la significación estadística de los datos se realizó con el programa SigmaPlot (versión 9), aplicando la distribución t de Student. Se consideró estadísticamente significativo un nivel de significancia igual o menor del 5 ($p \leq 0.05$). Los niveles de significancia se muestran como: ns, no significativo; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

RESULTADOS

1. Generación y análisis del fenotipo de ratones con inactivación específica de IGF-IR y sobreexpresión de AIB1 en la glándula mamaria (ratones IGF-IR^{GMKO}/tgAIB1).

1.1. Generación de ratones WT, tgAIB1, IGF-IR^{GMKO}, IGF-IR^{GMKO}/tgAIB1.

Para evaluar si AIB1 promueve hiperplasia mamaria mediante un incremento en la señalización a través de IGF-I/IGF-IR, se generaron ratones con una delección específica de *Igf1r* en la glándula mamaria (GM), ya que el *knockout* (KO) total es inviable, muriendo los ratones al nacer por fallo respiratorio (Liu et al. 1993). Esto ha sido posible gracias al uso del sistema de inactivación génica tejido-específica Cre-loxP, como se detalla en la sección “Materiales y métodos”. Cruzamos estos ratones con nuestro modelo murino que sobreexpresa moderadamente la variante humana de AIB1 en la GM, obteniendo los cuatro genotipos necesarios para el estudio (**Figura 16**):

***Igf1r*^{loxP/loxP}**: ratón portador de secuencias loxP pero no de *Cre*, por lo tanto no se produce la delección de *Igf1r*.

***MMTV-AIB1*^{+/-}/*Igf1r*^{loxP/loxP}**: ratón portador de secuencias loxP y del transgén AIB1 con expresión dirigida a la GM.

***MMTV-Cre*^{+/-}/*Igf1r*^{loxP/loxP}**: ratón portador de secuencias loxP y del transgén *Cre* con expresión dirigida a la GM. En este ratón se produce la delección de *Igf1r*.

***MMTV-Cre*^{+/-}/*Igf1r*^{loxP/loxP}/*MMTV-AIB1*^{+/-}**: ratón portador de secuencias loxP, y transgénico de *Cre* y *AIB1*. En este ratón se produce la delección de *Igf1r* y la sobreexpresión de AIB1 en la GM.

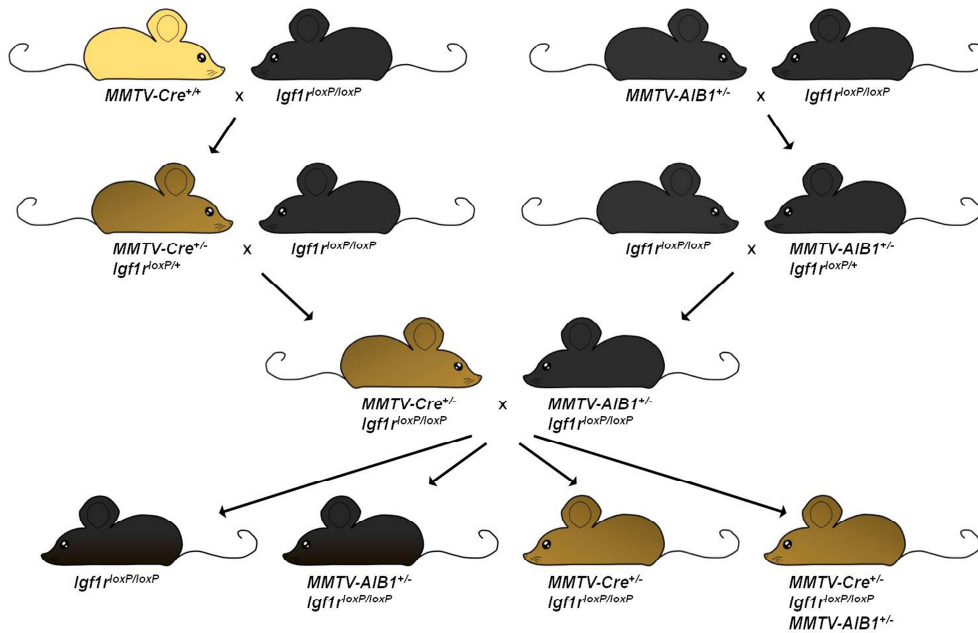


Figura 16. Esquema de los cruces realizados para obtener los 4 genotipos objeto de estudio. Ratones *MMTV-Cre*^{+/+}, que expresan la recombinasa Cre en la glándula mamaria, se cruzaron con ratones *Igf1*^{loxP/loxP}, caracterizados por tener el exón 3 del gen *Igf1r* flanqueado por secuencias loxP. En paralelo, se realizaron cruces con ratones *MMTV-AIB1*^{+/+}, que sobreexpresan el gen *AIB1* humano en la glándula mamaria.

Para poder obtener hembras de todos los genotipos en cantidad suficiente para el estudio, se establecieron numerosas jaulas de cruce. Todos los ratones utilizados se genotiparon tras el destete mediante biopsia de cola y posterior análisis por PCR con cebadores específicos para los distintos genes implicados: *Igf1r*, *AIB1* y *Cre*. En el caso de los transgenes *AIB1* y *Cre*, se añadieron a las reacciones de PCR cebadores Control para evitar falsos negativos debidos a fallos de amplificación (**Figura 17**).

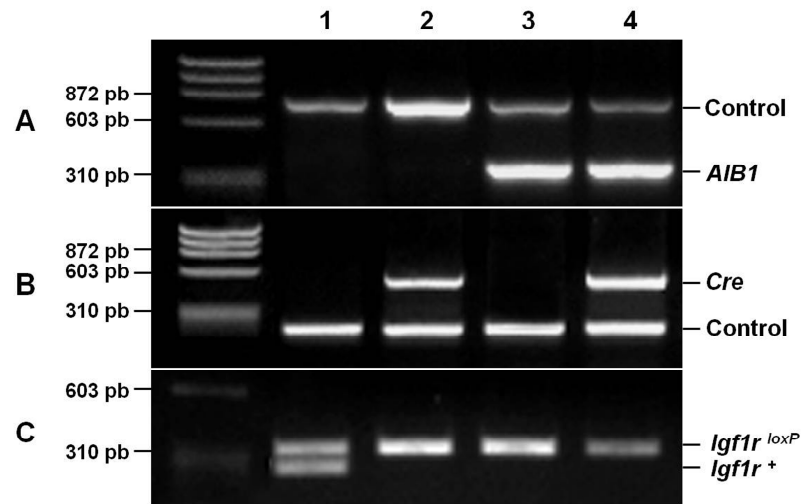


Figura 17. Genotipado de los ratones mediante PCR con ADN genómico procedente de biopsia de cola. Por cada ratón se prepararon 3 reacciones de PCR. A) Detección del transgén *AIB1*. B) Detección del transgén *Cre*. C) Detección de los alelos *floxado* (loxP) y silvestre (+) de *Igf1r*. Calle 1: ratón *Igf1r^{loxP/+}*; calle 2: ratón *MMTV-Cre^{+/-}/Igf1r^{loxP/loxP}*; calle 3: ratón *MMTV-AIB1^{+/-}/Igf1r^{loxP/loxP}*; calle 4: ratón *MMTV-Cre^{+/-}/Igf1r^{loxP/loxP}/MMTV-AIB1^{+/-}*.

Una vez obtenidos ratones de los 4 genotipos del estudio, se realizó una PCR con cebadores específicamente diseñados para comprobar si se producía la recombinación del exón 3 de *Igf1r* mediada por *Cre* (Figura 18).

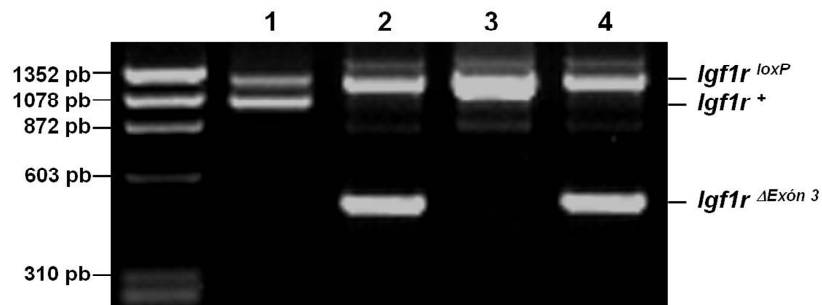


Figura 18. Comprobación de la delección del exón 3 de *Igf1r* producida por *Cre* en DNA genómico de biopsia de cola. Se realizó una PCR con cebadores que detectan la presencia de secuencias loxP y la delección del exón 3 de *Igf1r*. Calle 1: ratón *Igf1r^{loxP/+}*; calle 3: ratón *MMTV-AIB1^{+/-}/Igf1r^{loxP/loxP}*. En ambos casos no se observó el alelo delecionado (*Igf1r^{ΔExón 3}*). Calle 2: ratón *MMTV-Cre^{+/-}/Igf1r^{loxP/loxP}*; calle 4: ratón *MMTV-Cre^{+/-}/Igf1r^{loxP/loxP}/MMTV-AIB1^{+/-}*. Se detectó el alelo *Igf1r^{ΔExón 3}* en los dos ratones portadores de *Cre*.

En la **Figura 17** se observa que la presencia de secuencias loxP en ausencia de Cre no produjo ningún efecto en *Igf1r* (calle 1). La coexistencia de Cre y *AIB1* en un mismo ratón no interfirió en la actividad recombinasa de Cre, puesto que se detectó el alelo deleciónado (*Igf1r*^{ΔExón 3}) tanto en ausencia como en presencia de *AIB1* (calles 2 y 4). En los dos genotipos de ratones portadores de Cre (calles 2 y 4) se detectó el alelo deleciónado (*Igf1r*^{ΔExón 3}) como se había observado previamente en otros estudios similares (Cadoret et al. 2005; Holzenberger et al. 2000; Holzenberger et al. 2001; Kloting et al. 2008). En estos ratones portadores de Cre (calles 2 y 4) todavía quedaba una parte de *Igf1r* sin deleciónar (alelos *Igf1r*^{loxP}), probablemente debido a que la expresión de Cre bajo el control del promotor MMTV es exclusiva de célula epitelial y no se presenta en todos los tipos celulares existentes en la cola de ratón, y a que se ha descrito mosaicismo en su patrón de expresión (Wagner et al. 1997).

Las crías procedentes de los distintos cruces no mostraron diferencias de crecimiento, sugiriendo que en las hembras *MMTV-Cre*^{+/-}/*Igf1r*^{loxP/loxP} la lactancia no estaba impedida. Tras el destete, no se observó ninguna anomalía macroscópica de interés entre los distintos tipos de ratones, a excepción de una particularidad en la coloración del pelaje. Desde el primer cruce de ratones *MMTV-Cre*^{+/+} (pelaje amarillo) con ratones *Igf1r*^{loxP/loxP} (pelaje negro), el 100% de los ratones usados en este trabajo portadores de Cre tenían el pelaje de color amarillo pardo, algo más oscuro que los ratones *MMTV-Cre*^{+/+}. No se encontró ningún ratón portador de Cre que tuviera el pelaje negro, como se ha reflejado en la **Figura 16**. Los ratones portadores de Cre (amarillo pardo) tenían un pelaje menos acicalado y parecían *a priori* de mayor tamaño que los ratones no portadores de Cre (negros), característica más llamativa cuando los ratones envejecían. Por este motivo, se decidió pesar a las hembras vírgenes antes del sacrificio por si había alteraciones en el peso, no encontrándose diferencias significativas ni considerando cada genotipo por separado, ni al comparar ratones portadores de Cre (amarillo pardo) frente a no portadores (negro):

<i>MMTV-Cre</i> ^{+/-} / <i>Igf1r</i> ^{loxP/loxP}	23.16 ± 1.61 g
<i>MMTV-Cre</i> ^{+/-} / <i>Igf1r</i> ^{loxP/loxP} / <i>MMTV-AIB1</i> ^{+/-}	23.70 ± 1.65 g
<i>Igf1r</i> ^{loxP/loxP}	21.81 ± 0.85 g

<i>MMTV-AIB1</i> ^{+/-} / <i>Igf1r</i> ^{/loxP/loxP}	22.90 ± 1.06 g
Portador <i>Cre</i>	23.47 ± 1.58 g
No portador <i>Cre</i>	22.51 ± 1.09 g

No obstante, sí que se observaron discrepancias en el tamaño de las mamas, como se explica más adelante en este estudio.

Demostrada la delección en *Igf1r*, y teniendo en cuenta que los ratones *Igf1r*^{loxP/loxP} y los *MMTV-AIB1*^{+/-}/*Igf1r*^{/loxP/loxP} eran indistinguibles de ratones silvestres y transgénicos de *AIB1*, respectivamente, los cuatro genotipos comparados en este estudio serán nombrados de aquí en adelante del siguiente modo:

Igf1r^{loxP/loxP} → **WT**

MMTV-AIB1^{+/-}/*Igf1r*^{loxP/loxP} → **tgAIB1**

MMTV-Cre^{+/-}/*Igf1r*^{loxP/loxP} → **IGF-IR^{GMKO}**

MMTV-Cre^{+/-}/*Igf1r*^{loxP/loxP}/*MMTV-AIB1*^{+/-} → **IGF-IR^{GMKO}/tgAIB1**

1.2. Análisis del fenotipo de la glándula mamaria en ratones WT, tgAIB1, IGF-IR^{GMKO}, IGF-IR^{GMKO}/tgAIB1. Descubrimiento de la existencia de ratones *Igf1r*^{loxP/ΔExón 3}.

Una vez obtenidas más de 6 hembras de cada genotipo, se procedió a evaluar las alteraciones morfológicas producidas por la inactivación de IGF-IR y la sobreexpresión de AIB1 en la GM de hembras vírgenes.

Dada la enorme contribución de las hormonas sexuales a la morfología de la mama, a la hora de comparar las GM se tuvo en cuenta la fase del ciclo estral en la que se encontraban las hembras. Para ello, se realizó un frotis vaginal a cada hembra inmediatamente después del sacrificio (**Figura 19**).

	FASES DEL CICLO ESTRAL			
ESTADÍO	DIESTRO	PROESTRO	ESTRO	METAESTRO
COMPOSICIÓN CITOLÓGICA DEL FROTIS VAGINAL	Estado de reposo sexual. Se observan abundantes leucocitos y escasas células epiteliales nucleadas. Fluido vaginal mucoso.	Fase preparativa al estro. Caracterizada por la presencia de células epiteliales redondeadas y con núcleo voluminoso, solas o en grupos. Ausencia casi total de leucocitos.	Fase de celo. Se observan abundantes células cornificadas no nucleadas o con núcleo degenerado. Ausencia total de leucocitos.	Fase post ovulatoria. Disminuye el número de células cornificadas y vuelven a aparecer los leucocitos.

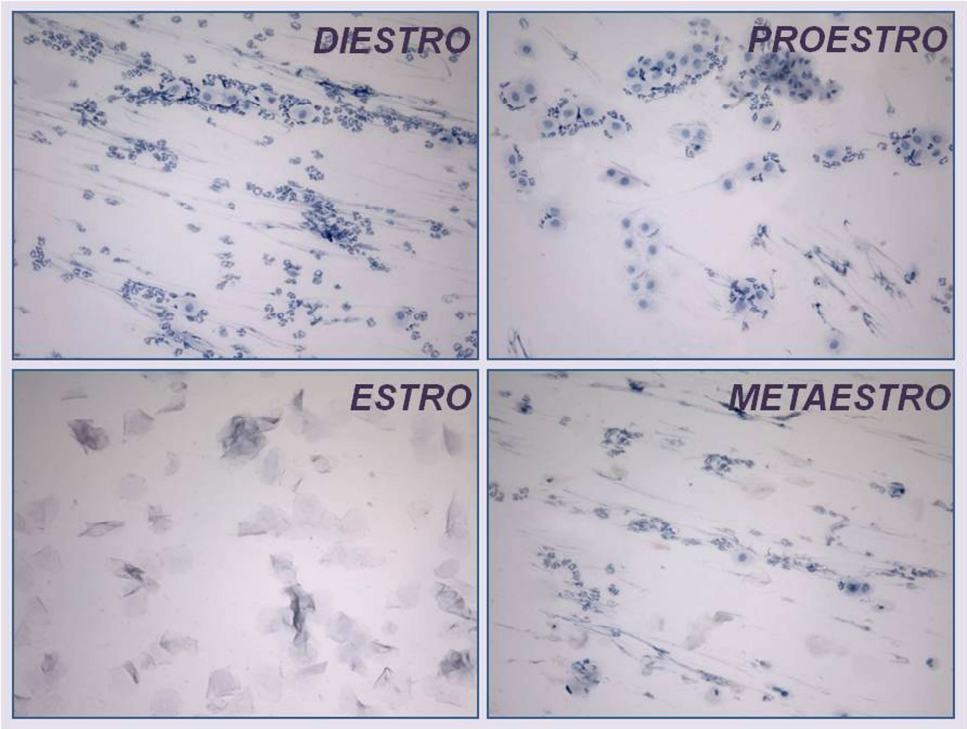


Figura 19. Análisis de las fases del ciclo estral. Se muestra un ejemplo representativo de un frotis vaginal teñido con hematoxilina/eosina perteneciente a cada fase del ciclo.

Para comenzar el análisis comparativo del fenotipo de los diferentes genotipos, se visualizó a nivel microscópico la morfología de la cuarta GM (abdominal izquierda) mediante la tinción de mama completa descrita en el apartado “Materiales y métodos”, ya que permite obtener una visión global del

desarrollo del epitelio mamario (**Figura 20**). Todas las hembras analizadas estaban en la fase de proestro.

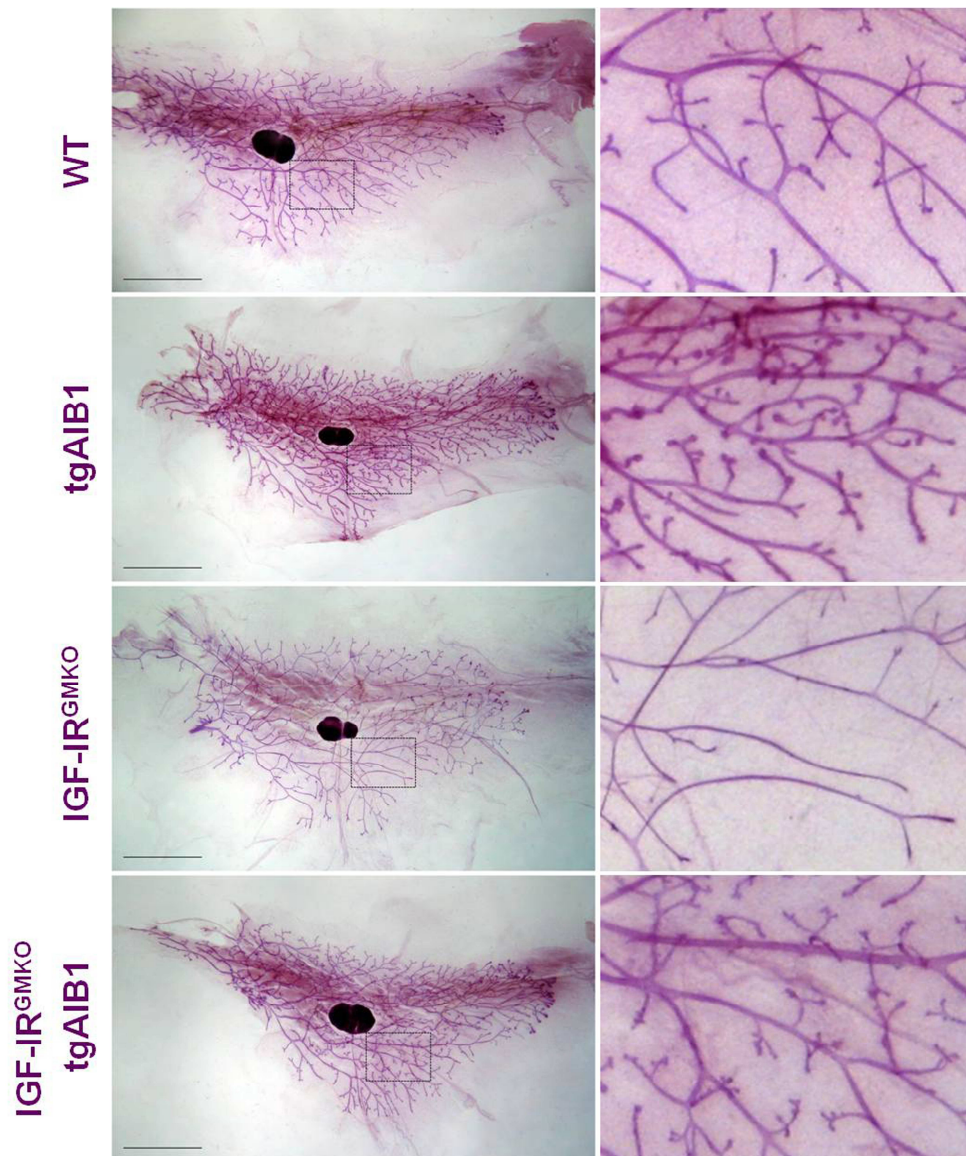


Figura 20. La expresión de IGF-IR no necesaria para la hiperplasia mamaria producida por AIB1. Glándulas mamarias de hembras vírgenes de 7 semanas de edad teñidas con carmín aluminio (tinción de mama completa). A la izquierda se muestra la visión general y a la derecha una magnificación del área enmarcada. Barra de escala 5 mm.

RESULTADOS

La GM correspondiente al animal tgAIB1 mostró un desarrollo ductal mayor que la del WT. La mama IGF-IR^{GMKO} presentó un crecimiento reducido. Por el contrario, cuando el déficit de IGF-IR se acompañaba de la sobreexpresión de AIB1 (IGF-IR^{GMKO}/tgAIB1), el desarrollo ductal era mayor. Sin embargo, a medida que se amplió el número de animales para completar este estudio encontramos algún caso dispar en la morfología y desarrollo ductal dentro de un mismo genotipo (**Figura 21**).

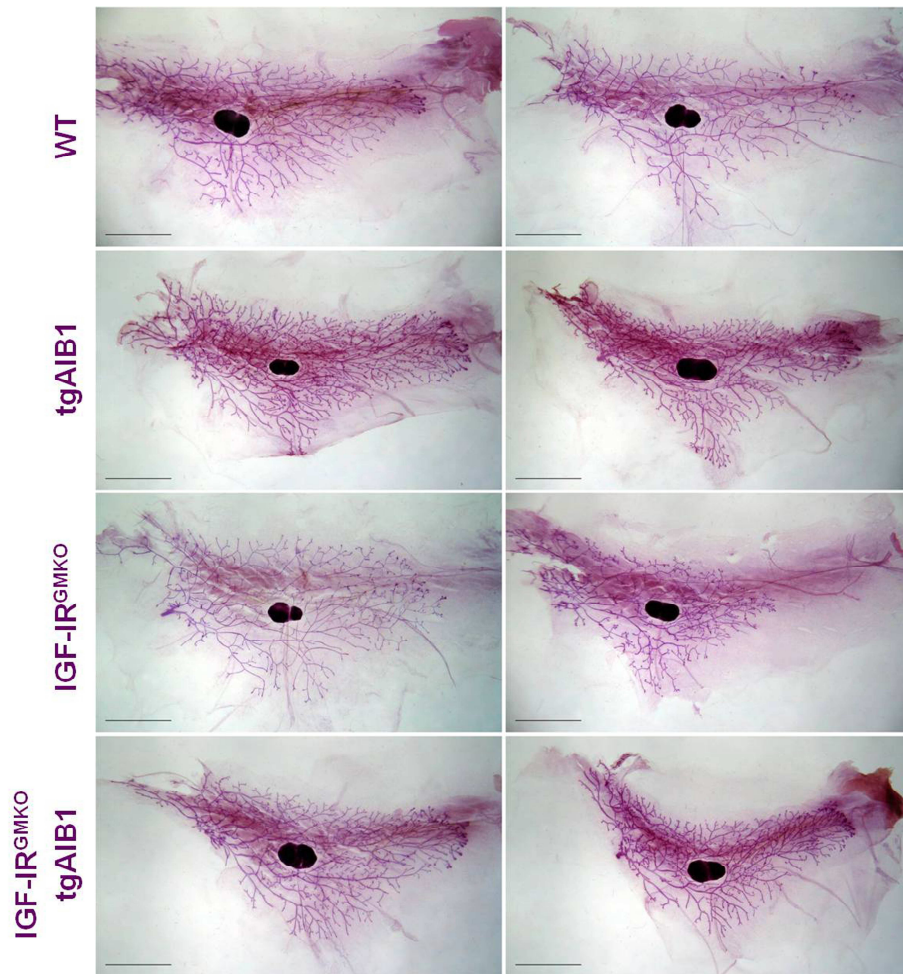


Figura 21. Pequeñas variaciones en la morfología de las mamas analizadas. Ejemplo comparativo de dos glándulas mamarias de cada genotipo, procedentes de hembras vírgenes de 7 semanas de edad teñidas con carmín aluminio. Barra de escala 5 mm.

En algunos casos no se apreciaron diferencias significativas en el desarrollo ductal de la GM (compárese WT del panel derecho con IGF-IR^{GMKO} del panel izquierdo de la **Figura 21**). Estos resultados sugieren que la manifestación fenotípica de los genotipos analizados no tenía una penetrancia del 100%, de modo que la delección de IGF-IR no estaría afectando en todos los ratones al desarrollo mamario. Alternativamente, es posible que la delección de IGF-IR no estuviera ocurriendo en todas las células del epitelio mamario, dándose un mosaicismo de delección debido a una expresión en mosaico de *Cre*.

Con objeto de averiguar el motivo de la variabilidad fenotípica, se extrajo DNA de la GM de todos los ratones usados para la tinción de mama completa. Se eligió esta estrategia en lugar de usar el DNA de la biopsia de cola usado para su genotipado, para correlacionar *in situ* el genotipo con el fenotipo. Se realizó la reacción de PCR descrita anteriormente en la **Figura 18**, que permite detectar los alelos *Igf1r*^{loxP}, *Igf1r*⁺ e *Igf1r*^{ΔExón 3}. Este tipo de PCR no se preparaba de forma rutinaria para el genotipado de los ratones mediante biopsia de cola, pero sí se realizó inicialmente con las primeras camadas de los cruces para comprobar que el sistema Cre-loxP funcionaba en nuestro modelo animal.

En la **Figura 22** se muestra un ejemplo de los productos de PCR obtenidos en 12 de los DNA testados. Todos los ratones del cruce de la generación F2 mostraron un genotipo *Igf1r*^{loxP/loxP}, siendo algunos también transgénicos de *Cre* y/o de *AIB1*. Un resultado esperado era que solo los ratones con genotipo *MMTV-Cre*^{+/-}/*Igf1r*^{loxP/loxP}, independientemente de si también eran *MMTV-AIB1*^{+/-}, debían presentar la banda correspondiente al alelo de *Igf1r* delecionado (*Igf1r*^{ΔExón 3}). Sin embargo, algunos de los ratones que no eran transgénicos de *Cre* presentaban la delección en *Igf1r* (indicado con asteriscos en las calles 9, 11 y 12 de la **Figura 22**). La especificidad de esta reacción de PCR ya había sido comprobada previamente empleando DNA de ratones *Igf1r*^{+/+}, *Igf1r*^{loxP/+}, *MMTV-Cre*^{+/-}/*Igf1r*^{loxP/+}, por lo que la veracidad de la banda observada no se cuestionó.

Estos resultados sólo podían explicarse si el alelo delecionado era algo heredado en el ratón, y no un proceso de recombinación postnatal.

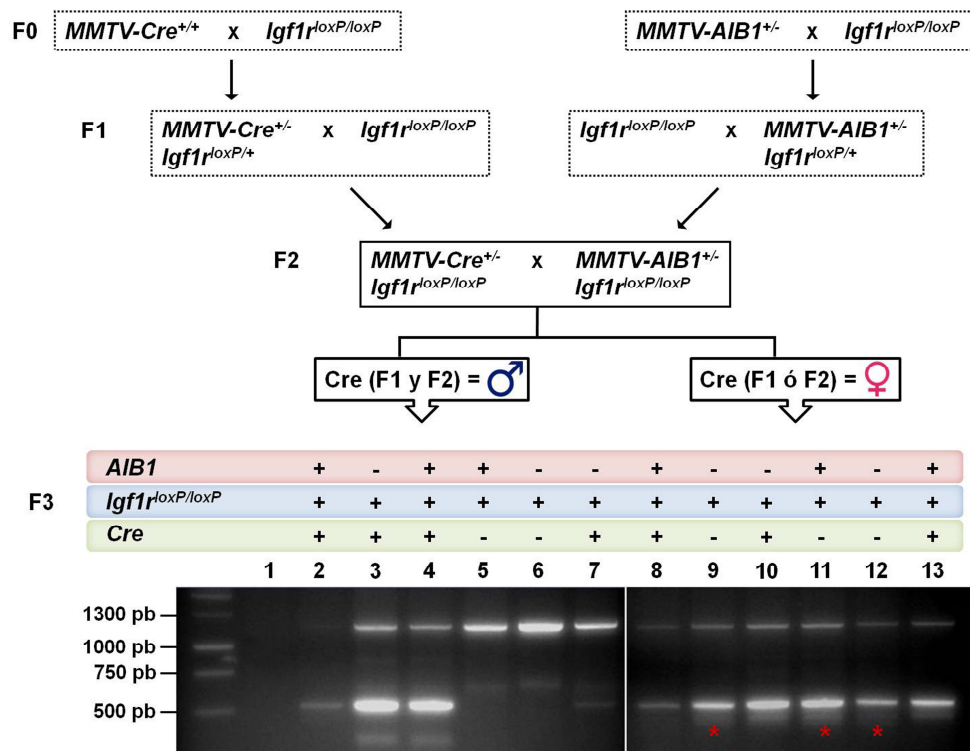


Figura 22. Detección del alelo *Igf1^{ΔExón 3}* en ausencia de Cre. El DNA extraído de glándula mamaria se usó en una reacción de PCR para detectar alelos *Igf1^{loxP}* e *Igf1^{ΔExón 3}* según se muestra en la Figura 23. Calle 1: control negativo sin ADN. Calles 2-7: descendencia procedente de cruces con un ratón *MMTV-Cre^{+/+}* macho en la F1 y en la F2. Calles 8-13: progenie obtenida de cruces con ratón *MMTV-Cre^{+/+}* hembra en la F1 y/o en la F2. Las bandas marcadas con un asterisco corresponden a los alelos *Igf1^{ΔExón 3}*. Su presencia en ratones no transgénicos de Cre sugiere que la delección ocurrió en células germinales de una hembra antecesora que sí era transgénico de Cre.

Una vez completado el análisis de todos los DNA se observó que la delección de *Igf1r* aparecía en ratones destetados el mismo día, por lo que se realizó una reconstrucción meticulosa de los genotipos de los cruces previos establecidos para generar los ratones empleados en este estudio. De este modo, se observó una correlación clara entre el tipo de cruce del que provenían los ratones, y la presencia o no del alelo de *Igf1r* delecionado: todos los ratones que mostraban el alelo *Igf1^{ΔExón 3}* sin ser transgénicos de Cre, descendían de cruces

en los que en alguna generación, ya fuera F1, F2 o ambas se había usado a la hembra como la portadora de Cre. En la F3, solo se obtenía un alelo *Igf1r* íntegro (no delecionado) en ausencia de Cre, si se había usado un macho *MMTV-Cre^{+/-}* en la F1 y también en la F2 (**Figura 22**, parte superior).

Estos resultados sugieren que, pese a que el promotor MMTV es específico de célula epitelial, la expresión de Cre había tenido lugar bien en la línea germinal femenina de las hembras.

Se ha descrito que el promotor MMTV dirige la expresión de Cre a distintos tejidos y tipos celulares concretos. En este sentido, se han establecido 2 cepas comerciales de ratones *MMTV-Cre*, cuya diferencia principal reside en el momento de inicio de la expresión de Cre, y en si esta proteína se expresa o no en la línea germinal femenina (Wagner et al. 2001). La línea D adquirida para este proyecto, está descrito que presenta una expresión de Cre en el epitelio mamario coincidente con la activación de las hormonas ováricas, aproximadamente a los 22 días de vida postnatal, pero no se detecta expresión de la recombinasa en oocitos. Por el contrario, en la línea A, Cre se expresa en la GM a partir del 6º día de vida y en los oocitos durante el desarrollo folicular.

En contra de lo esperado en nuestro modelo animal, todos los descendientes de hembras *MMTV-Cre^{+/-}* y portadoras de algún alelo *Igf1r^{loxP}*, nacerían con un alelo *Igf1r^{ΔExón 3}*, independientemente de que hubieran o no heredado Cre. Con todo ello, las diferencias morfológicas observadas en la **Figura 21** pueden ser explicadas por la deleción de *Igf1r* en células germinales de hembras portadoras de Cre. A pesar de que la línea D está descrita como carente de expresión de Cre en oocitos, una posible explicación a este fenómeno sería que el cruce entre distintas cepas para generar los ratones de la F1 y F2 hubiera activado dicha expresión.

Esta deleción inesperada de *Igf1r* en células germinales de hembras también puede explicar los distintos porcentajes de descendientes con un alelo *Igf1r* delecionado, según fuera la estrategia seguida para establecer los cruces.

GENOTIPOS		F1 ♂ MMTV-Cre ^{+/+} /Igf1 ^{loxP/+}		F1 ♀ MMTV-Cre ^{+/+} /Igf1 ^{loxP/+}	
		F2 ♂ MMTV-Cre ^{+/+} /Igf1 ^{loxP/loxP}	F2 ♀ MMTV-Cre ^{+/+} /Igf1 ^{loxP/loxP}	F2 ♂ MMTV-Cre ^{+/+} /Igf1 ^{loxP/loxP}	F2 ♀ MMTV-Cre ^{+/+} /Igf1 ^{loxP/loxP}
F3	Igf1 ^{loxP/loxP}	25 %		12,5 %	
	Igf1 ^{loxP/ΔExón 3}		25 %	12,5 %	25 %
	MMTV-AIB1 ^{+/+} /Igf1 ^{loxP/loxP}	25 %		12,5 %	
	MMTV-AIB1 ^{+/+} /Igf1 ^{loxP/ΔExón 3}		25 %	12,5 %	25 %
	MMTV-Cre ^{+/+} /Igf1 ^{loxP/loxP}	25 %		12,5 %	
	MMTV-Cre ^{+/+} /Igf1 ^{loxP/ΔExón 3}		25 %	12,5 %	25 %
	MMTV-Cre ^{+/+} /Igf1 ^{loxP/loxP} /MMTV-AIB1 ^{+/+}	25 %		12,5 %	
	MMTV-Cre ^{+/+} /Igf1 ^{loxP/ΔExón 3} /MMTV-AIB1 ^{+/+}		25 %	12,5 %	25 %

Tabla 3. Porcentaje de ratones de cada genotipo. El tipo de descendencia varía en función de si se utiliza una hembra o un macho portador del transgén Cre, como se ha explicado en la Figura 22.

1.3. Cambio en la estrategia de los cruces establecidos para la generación de ratones WT, tgAIB1, IGF-IR^{GMKO}, IGF-IR^{GMKO}/tgAIB1.

Como se ha explicado en el apartado 1.2, se obtuvieron ratones con una delección congénita en *Igf1r* y no producida de forma postnatal por la recombinación de los sitios loxP causada por Cre. Este hecho produjo animales *Igf1r^{loxP/loxP}* y *MMTV-AIB1^{+/+}/Igf1r^{loxP/loxP}* que, aun no teniendo Cre en su genotipo, contenían un alelo delecionado de *Igf1r*. Mediante la estrategia de PCR mostrada en la **Figura 22** se podría haber comprobado si los ratones eran o no portadores de este alelo heredado *Igf1r^{ΔExón 3}* con el fin de excluirlos del estudio. Sin embargo, en los ratones *MMTV-Cre^{+/+}/Igf1r^{loxP/loxP}* y *MMTV-Cre^{+/+}/Igf1r^{loxP/loxP}/MMTV-AIB1^{+/+}* existía una variable que no estaba bajo control, la posibilidad de distinguir entre el alelo *Igf1r^{ΔExón 3}* heredado del generado en el propio animal de estudio. Poder hacer esta distinción era de suma importancia, puesto que la delección que se

produce en los oocitos se hereda en todo el organismo a diferencia de la generada a nivel postnatal. En referencia a la GM, estaríamos comparando mamas con déficit de IGF-IR estromal (heredado) y epitelial (heredado y postnatal) frente a GM con déficit de IGF-IR solo a nivel epitelial.

Por este motivo, se decidió establecer de nuevo todos los cruces siguiendo un orden equivalente al original pero teniendo en cuenta el sexo y el genotipo de cada pareja (**Figura 23**).

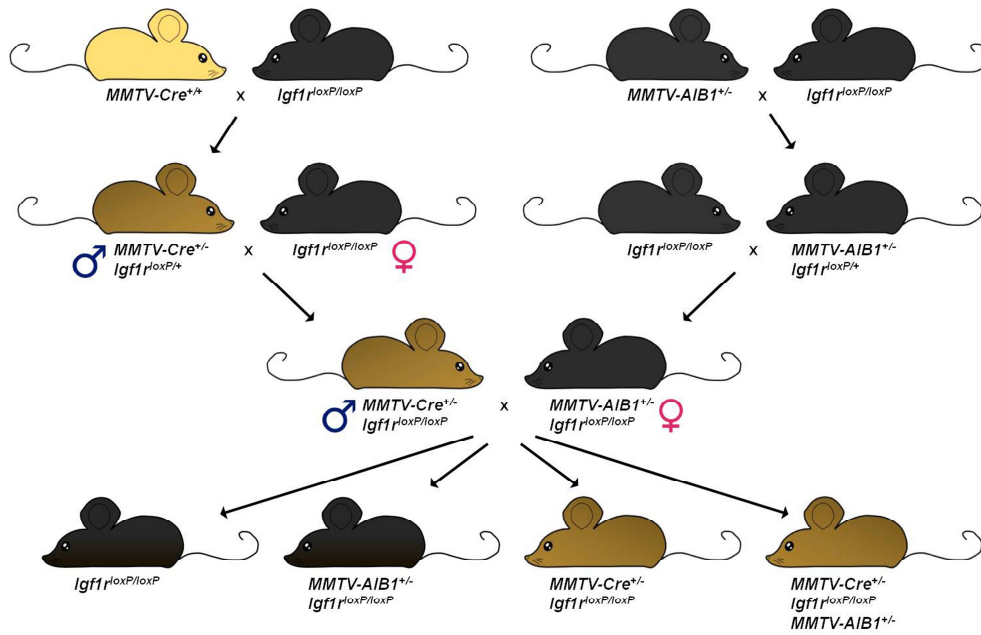


Figura 23. Nueva estrategia de cruces realizados para obtener los 4 genotipos objeto de estudio. Se indica con el símbolo masculino o femenino cuando el sexo del ratón es decisivo en el tipo de cruce. En los demás casos el sexo del ratón no es determinante.

1.4. Análisis del fenotipo de la glándula mamaria en ratones WT, tgAIB1, IGF-IR^{GMKO}, IGF-IR^{GMKO}/tgAIB1.

1.4.1. Análisis mediante tinción de mama completa.

Con objeto de obtener una visión global del desarrollo de la mama, se extrajo la cuarta glándula mamaria (abdominal izquierda) de hembras vírgenes de 7 y 11 semanas de edad pertenecientes a los 4 genotipos anteriormente citados: WT, tgAIB1, IGF-IR^{GMKO} e IGF-IR^{GMKO}/tgAIB1. Los tejidos se fijaron y se realizó una tinción con carmín aluminio, que permitió analizar el grado de desarrollo, ramificaciones y proporción en que los ductos epiteliales ocupan el estroma o *fat pad* mamario, lo cual es un indicador de proliferación celular y permite detectar hiperplasias así como lesiones neoplásicas y preneoplásicas.

En la **Figura 24** se muestra la morfología típica de la GM de un ratón silvestre (WT) de 7 semanas de edad. A esta edad, los ductos han ido creciendo de dos formas: elongándose desde el pezón hacia el extremo dorsal del estroma sin llegar todavía a alcanzarlo, y ramificándose lateralmente dando lugar a ductos secundarios que irán colonizando y ocupando el estroma.

La GM del animal tgAIB1 presentaba mayor elongación ductal, y sobre todo mayor número de ramificaciones que la GM WT.

La GM deficiente en IGF-IR mostró un crecimiento reducido. Los ductos se habían elongado y ramificado menos que en el animal WT.

La GM IGF-IR^{GMKO}/tgAIB1, a diferencia de la GM IGF-IR^{GMKO}, había recuperado el crecimiento ductal asemejándose más a la morfología de la tgAIB1.

A las 11 semanas de edad (**Figura 25**), los ductos habían alcanzado prácticamente el extremo dorsal del estroma. Por ello, en sentido longitudinal, no se apreciaban cambios entre los distintos genotipos, algo que además se veía reforzado visualmente por el hecho de que las GM de los ratones transgénicos de *Cre* eran más grandes. Sin embargo, sí que se observaron diferencias en el rellenado del estroma. La mama tgAIB1 presentaba mayor densidad de ductos. La GM IGF-IR^{GMKO} tenía un estroma más despoblado y al igual que ocurría a las 7

semanas, la GM IGF-IR^{GMKO}/tgAIB1 presentaba un desarrollo mayor, parecido al de la GM tg AIB1.

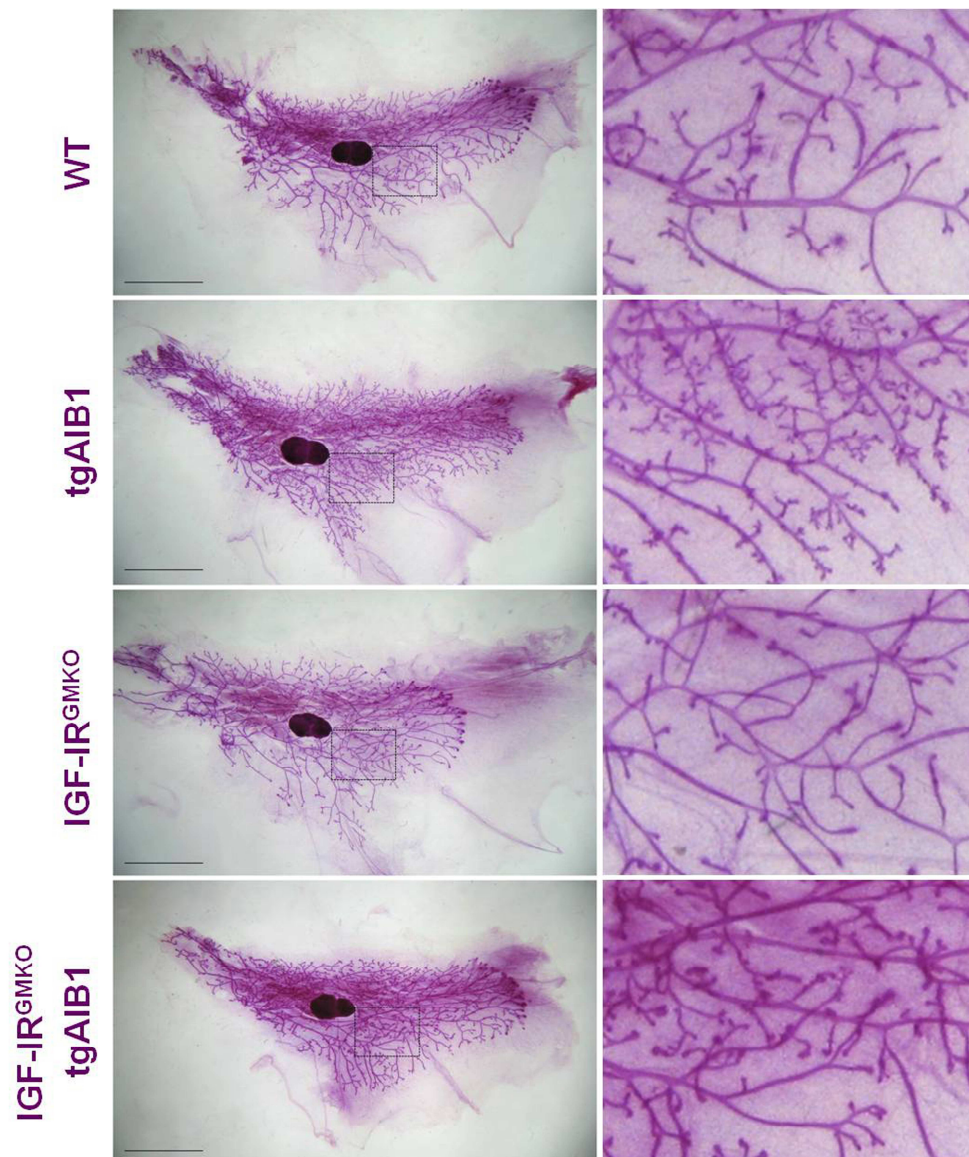


Figura 24. La sobreexpresión de AIB1 en mamas deficientes en IGF-IR produce un aumento del crecimiento ductal. Glándulas mamarias de hembras vírgenes de 7 semanas de edad teñidas con carmín aluminio. A la izquierda se muestra la visión general y a la derecha una magnificación del área enmarcada. Barra de escala 5 mm.

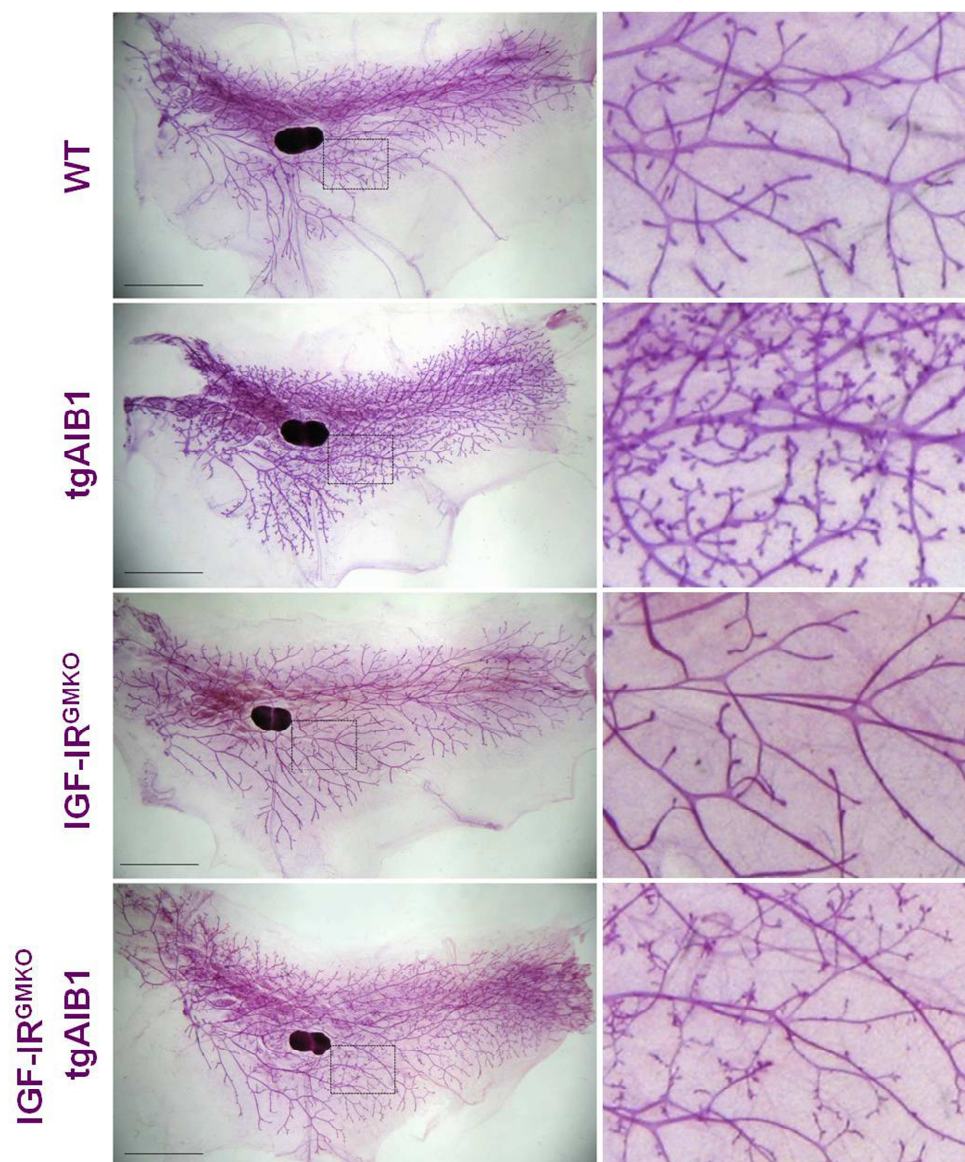


Figura 25. La sobreexpresión de AIB1 en mamas deficientes en IGF-IR produce un aumento de densidad ductal. Glándulas mamarias de hembras vírgenes de 11 semanas de edad teñidas con carmín aluminio. A la izquierda se muestra la visión general y a la derecha una magnificación del área enmarcada. Barra de escala 5 mm.

1.4.2. Análisis morfométrico.

Tras el análisis morfológico de la GM en los 4 genotipos, se cuantificaron varios parámetros mesurables con objeto de establecer datos objetivables y sus desviaciones en las diferencias observadas. Para este fin, se emplearon imágenes de las tinciones de mama completa (visión general) de 4 a 6 ratones por grupo tomadas a las 7 y 11 semanas de edad.

En la **Figura 26** se muestran las medidas de la longitud máxima del epitelio ductal de la mama o penetración ductal, parámetro tradicionalmente usado y basado en la distancia desde el nódulo linfático central hasta el final del ducto más largo. En la **Figura 26 A** se muestra el resultado obtenido usando esta medida. A las 7 semanas existían diferencias significativas que confirmaban la morfología observada en la tinción: las mamas con déficit en IGF-IR recuperaban el desarrollo ductal cuando sobreexpresaban AIB1. Sin embargo, a las 11 semanas no se apreciaron cambios significativos. A esta edad se observó un aumento del tamaño de las mamas de ratones IGF-IR^{GMKO} e IGF-IR^{GMKO}/tgAIB1 (**Figura 26 B**), lo que pudiera llevar a error en una medida absoluta como esta. Por ello, tomando esto en consideración, se decidió medir la penetración ductal relativa, es decir, la distancia desde el nódulo linfático central hasta el ducto más largo, pero referida al tamaño total del estroma (**Figura 26 C**). En este caso, sí que se apreciaron diferencias significativas a las 7 y a las 11 semanas de edad, aunque sutiles en el caso de 11 semanas. Estas medidas relativas revelaron que la GM IGF-IR^{GMKO}/tgAIB1 a las 7 semanas no había crecido tanto como la WT, por el contrario, a las 11 semanas se había recuperado la penetración ductal superando el valor obtenido en la mama WT.

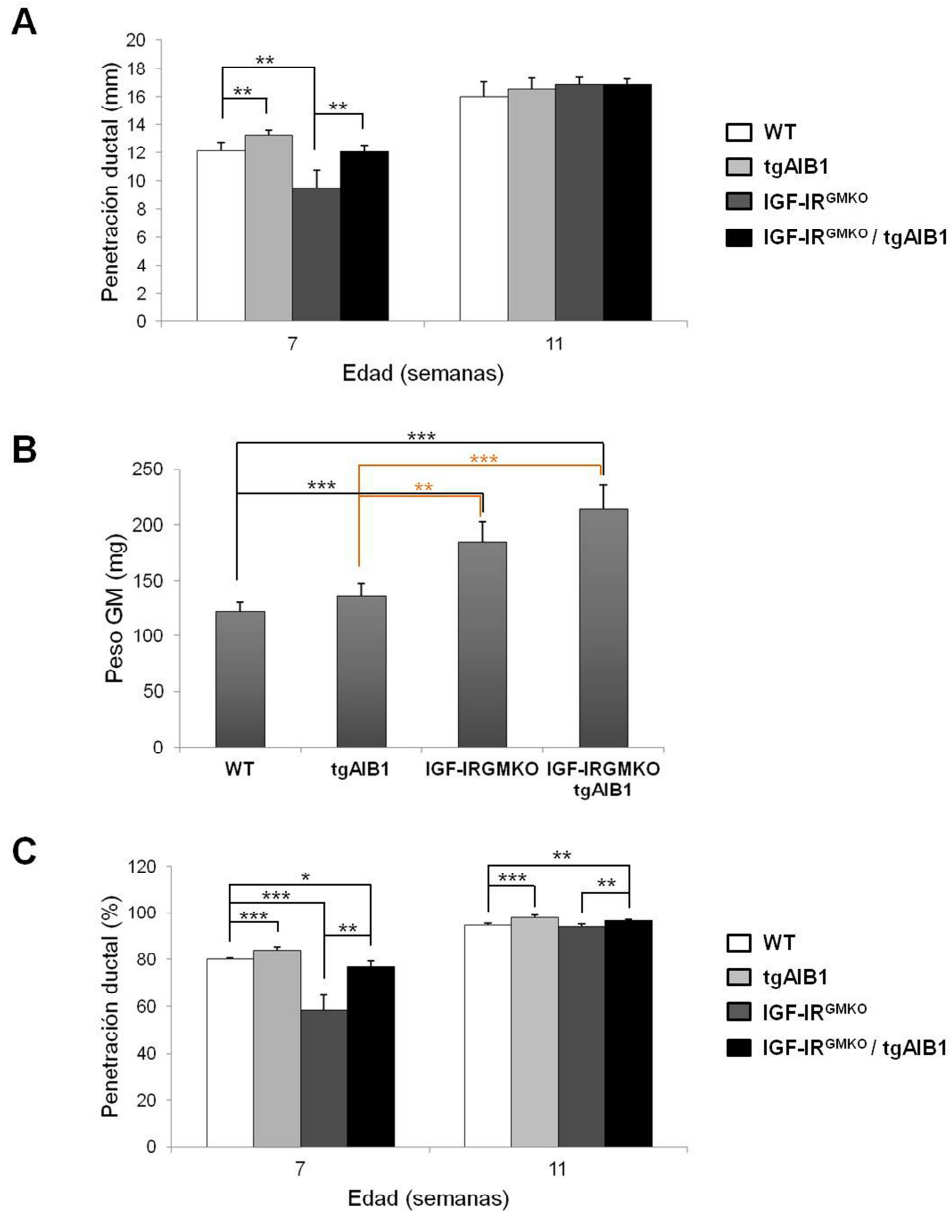


Figura 26. La sobreexpresión de AIB1 aumenta la longitud del epitelio ductal de la mama independientemente de IGF-IR. A) Penetración ductal medida en mm, desde el centro del nódulo linfático hasta el ducto más largo. n=6 WT y tgAIB1; n=4 IGF-IR^{GKO} y IGF-IR^{GKO}/tgAIB1. B) Peso en mg de las mamas extraídas. n=5 WT y tgAIB1; n=4 IGF-IR^{GKO} y IGF-IR^{GKO}/tgAIB1. C) Penetración ductal medida en porcentaje, referida a la longitud total del estroma. n= 6 WT y tgAIB1; n=4 IGF-IR^{GKO} y IGF-IR^{GKO}/tgAIB1. Las barras representan el valor medio \pm DE. (Diferencias significativas *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 mediante test T de Student).

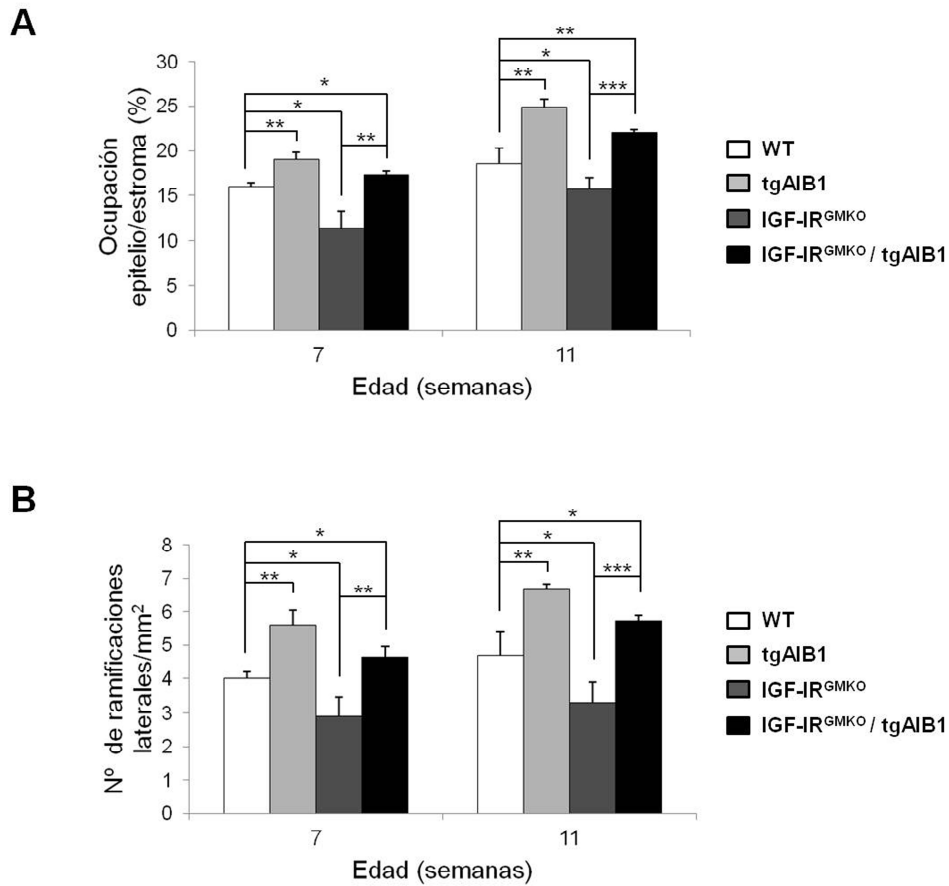


Figura 27. El aumento de ocupación del estroma por el árbol ductal en ratones tgAIB1 es independiente de IGF-IR. A) La reducción del porcentaje de ocupación epitelio/estroma en los ratones IGF-IR^{GKO} fue significativamente restaurada por la sobreexpresión de AIB1. Se analizaron imágenes de tinción de mama completa mediante el software ImageJ 1.42q. El porcentaje de ocupación se obtuvo dividiendo el área ocupada por el árbol ductal por el área total del estroma en 3 animales de cada genotipo. Las barras representan el valor medio \pm DE. (Diferencias significativas * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ mediante test T de Student). B) El número de ramificaciones en los ductos aumenta con la sobreexpresión de AIB1. Se analizaron imágenes de tinción de mama completa con el software Sigma Scan Pro 5.0 añadiendo una capa con una rejilla de 3x3 mm. El número de puntos de ramificación se contó en 2 campos (7 semanas) o 3 campos (11 semanas) por cada imagen de la tinción. La gráfica representa el número medio de ramificaciones/mm² en 3 animales de cada genotipo \pm DE. (Diferencias significativas * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ mediante test T de Student).

Las diferencias entre genotipos a las 11 semanas de edad parecían estar en la densidad de ductos que rellenaban el estroma (**Figura 25**). Por ello, a pesar de haber obtenido cambios significativos en la longitud de los ductos, se consideró la penetración ductal como un parámetro insuficiente para comparar entre los distintos grupos. Por este motivo, se decidió considerar también la contribución de todos los ductos de la mama y no basar la medida solamente en la longitud de los ductos más largos. Con dicha finalidad se calculó el área ocupada por el árbol ductal frente al área total del estroma.

En la **Figura 27 A** se observa que el porcentaje de ocupación del estroma por parte de los ductos aumentó en los ratones que sobreexpresaban AIB1, independientemente de que fueran deficientes en IGF-IR. A las 7 semanas de edad se encontraron diferencias significativas similares a las mostradas en la **Figura 26**. En el caso de 11 semanas, las variaciones en el porcentaje de ocupación fueron mucho más evidentes. Al tener en cuenta el crecimiento ductal en todas las direcciones y no solo hacia el extremo dorsal del estroma, se apreciaba que a las 11 semanas la sobreexpresión de AIB1 en mamas deficientes en IGF-IR conseguía restaurar el desarrollo ductal.

Para confirmar que el incremento en el porcentaje de ocupación epitelio/estroma era debido a un aumento del número de ramificaciones y no a un engrosamiento de los ductos (lo cual también provocaría un incremento en el área ductal medida en la Figura 27 A), se calculó el número de puntos de bifurcación en 1 mm², tomando como guía las imágenes de las tinciones de mama completa. La sobreexpresión de AIB1 produjo, además de un mayor crecimiento de los ductos, un aumento muy significativo en el número de ramificaciones (**Figura 27 B**).

Estos resultados indican que la sobreexpresión de AIB1 promueve el incremento del desarrollo ductal en todas sus dimensiones, siendo este aumento independiente de IGF-IR.

1.5. Análisis histológico de la glándula mamaria de ratones WT, tgAIB1, IGF-IR^{GMKO}, IGF-IR^{GMKO}/tgAIB1.

1.5.1. Expresión de la proteína IGF-IR en el epitelio de la glándula mamaria de ratones IGF-IR^{GMKO}.

Con objeto de confirmar la pérdida epitelial de la proteína IGF-IR en la mama de ratones IGF-IR^{GMKO}, realizamos un análisis inmunohistoquímico de la GM número 9 (abdominal derecha) de hembras vírgenes WT y IGF-IR^{GMKO}. Adicionalmente, quisimos comprobar que la expresión de Cre era específica de epitelio y el grado de heterogeneidad que mostraba (patrón de expresión en mosaico) como se indicó anteriormente en este trabajo (**Figura 18**). En primer lugar, se realizó una inmunohistoquímica con anticuerpos para detectar IGF-IR y Cre. Como se muestra en la **Figura 28**, la inmunodetección de Cre se confinó exclusivamente al epitelio. No se detectó reactividad en el estroma. Como se esperaba, la expresión de Cre solo se detectó en algunas células del ducto mamario, confirmando el mosaicismo.

La tinción de IGF-IR, que debería ser mayoritariamente de membrana, resultó poco sensible como para poder valorar diferencias entre WT y IGF-IR^{GMKO}. A diferencia de condiciones en que se sobreexpresa IGF-IR (por ejemplo en tumores), las mamas de ratones WT mostraron una tinción débil para IGF-IR, por lo que en ratones IGF-IR^{GMKO} la distinción entre células positivas y células deficientes en IGF-IR resultó infructuosa.

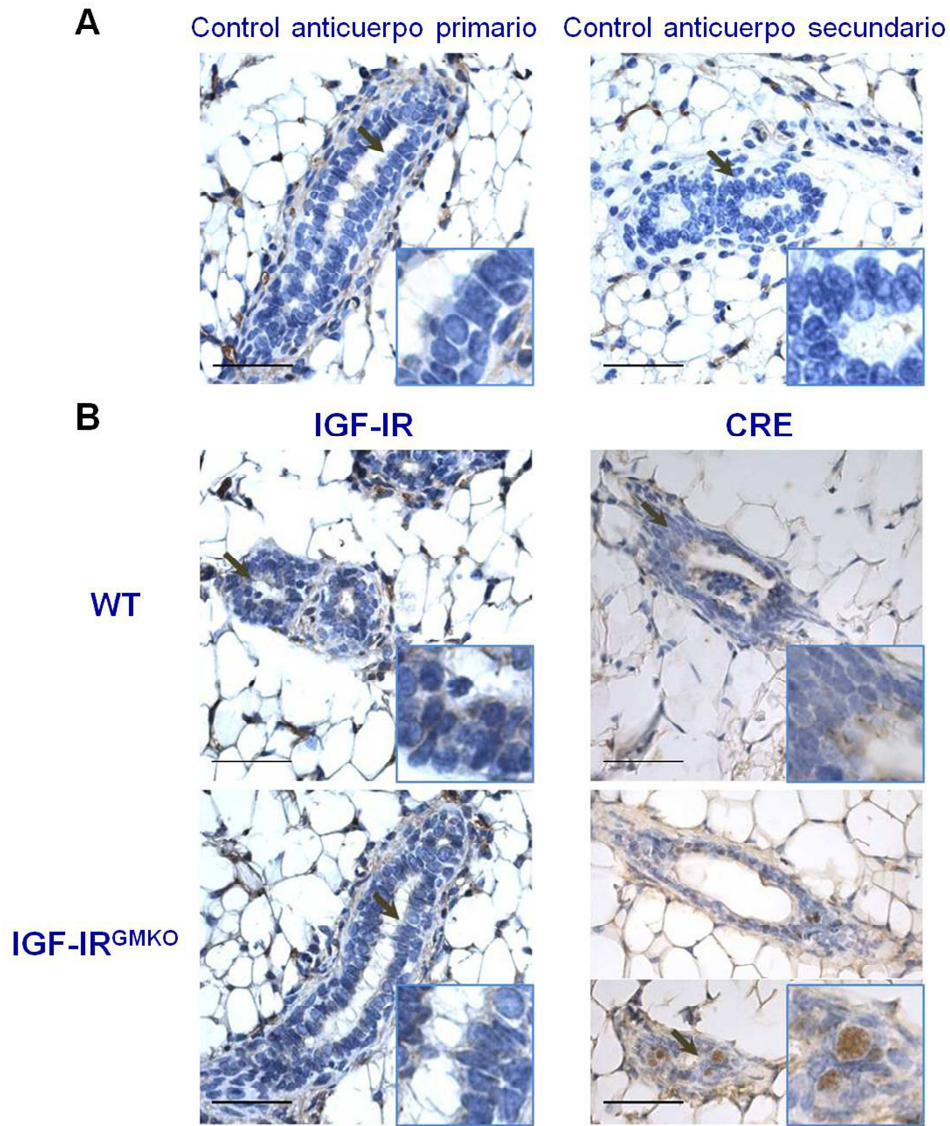


Figura 28. Detección de IGF-IR y Cre en secciones de tejido mamario de ratones WT y IGF-IR^{GMKO}. A) Controles de inmunohistoquímica con los anticuerpos usados en B. Para el control de anticuerpo primario se usó suero preinmune de conejo por ser ésta la especie en que se generaron los dos anticuerpos empleados. En el control de anticuerpo secundario se omitió la incubación con anticuerpo primario. B) Inmunohistoquímica representativa de la expresión de IGF-IR y Cre en secciones de tejido de glándula mamaria en los genotipos indicados a la izquierda. Las flechas indican la región que se muestra magnificada. Barra de escala: 50 μm. Contratinción: hematoxilina.

Con objeto de correlacionar la expresión de Cre con la pérdida de IGF-IR en el epitelio, decidimos hacer dobles tinciones de inmunofluorescencia empleando ambos anticuerpos en un mismo corte de tejido. Sin embargo, el anticuerpo anti-Cre no funcionó como en las tinciones de inmunohistoquímica, dando lugar a una alta inespecificidad con el revelado fluorescente (**Figura 29**). En el tejido WT la tinción dio mucha señal de fondo y mayoritariamente citosólica en lugar de nuclear, al igual que en el tejido IGF-IR^{GMKO}.

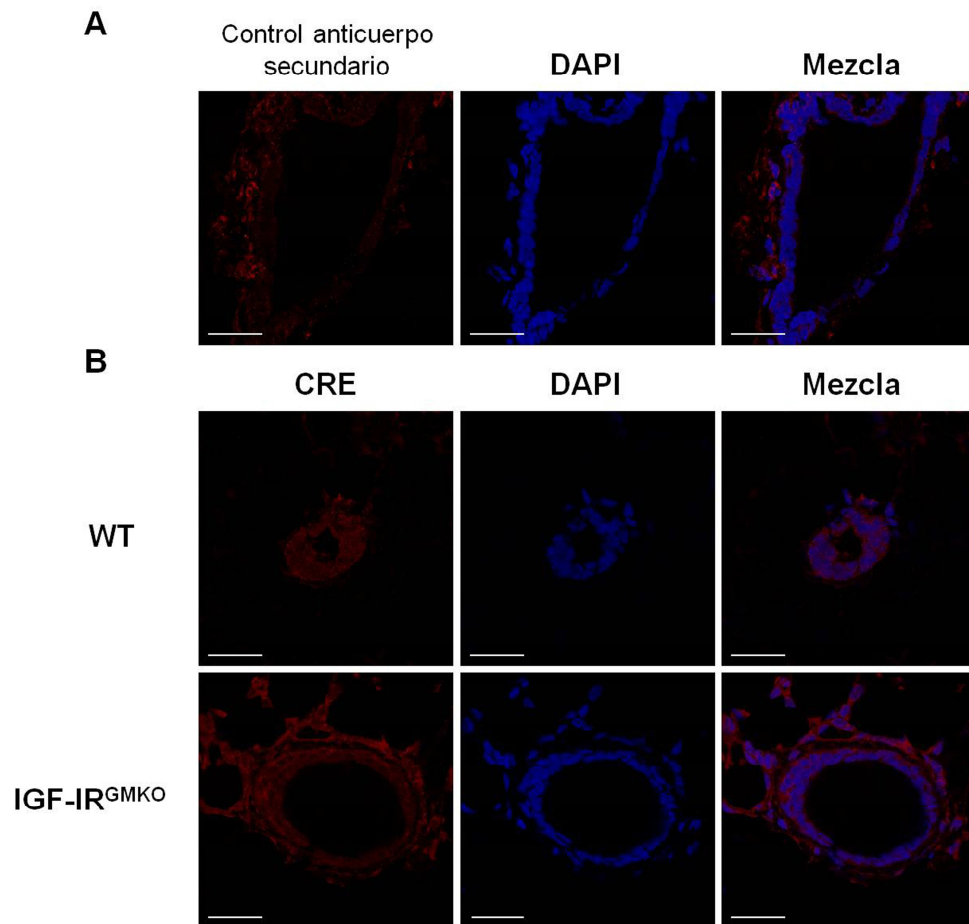


Figura 29. La detección de Cre mediante inmunofluorescencia resultó en una elevada señal de fondo e inespecificidad. Secciones de tejido mamario de ratones WT y IGF-IR^{GMKO} se incubaron con: A) Anticuerpo secundario Cy3, B) Anti-Cre. Se muestra el marcaje con DAPI como contratinción. Barra de escala: 25 μm.

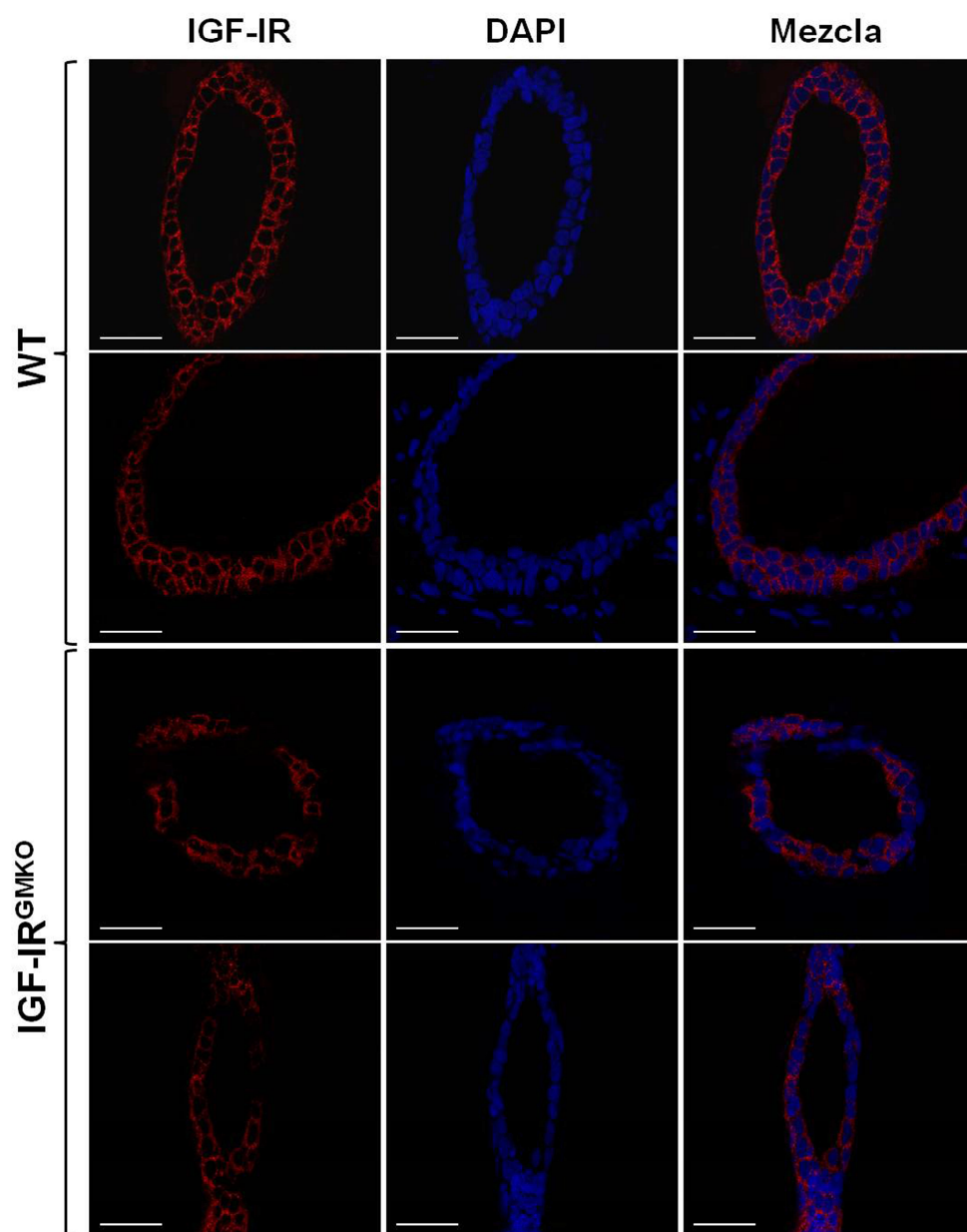


Figura 30. La expresión de la proteína IGF-IR es ubicua en el tejido mamario de ratones WT y en mosaico en la mama de ratones IGF-IR^{GKO}. Secciones de mama de ratones WT y IGF-IR^{GKO} de 11 semanas de edad se incubaron con anti-IGF-IR y se realizó una contratinción con DAPI. Imágenes tomadas con microscopía confocal. Barra de escala: 25 μ m.

A diferencia de la tinción de inmunohistoquímica, la inmunofluorescencia para detectar IGF-IR funcionó correctamente. Se obtuvo una señal específica en la membrana de las células epiteliales de los ductos mamarios. En la **Figura 30** se muestran tinciones típicas de dos cortes de tejido para cada genotipo. En las secciones WT el marcaje de IGF-IR era homogéneo y estaba presente en prácticamente todas las células. Por el contrario, en los cortes de animales IGF-IR^{GMKO}, la señal de IGF-IR estaba ausente en algunas células del ducto mamario. Aunque no conseguimos las condiciones adecuadas para obtener una doble tinción satisfactoria, el patrón de señal obtenido con el anticuerpo anti-IGF-IR demostró que existía mosaicismo en la delección de IGF-IR, confirmando estudios previos relativos a la expresión de Cre.

1.5.2. Expresión del marcador de proliferación PCNA en el epitelio de la glándula mamaria de ratones WT, tgAIB1, IGF-IR^{GMKO}, IGF-IR^{GMKO}/tgAIB1.

Para confirmar el aumento en el crecimiento y ramificación ductal que presentan las mamas que sobreexpresan AIB1 (tgAIB1 y IGF-IR^{GMKO}/tgAIB1), realizamos una inmunohistoquímica en secciones de tejido mamario de los cuatro genotipos de este estudio para detectar el marcador de proliferación PCNA.

En la **Figura 31 A** se muestran los controles de especificidad de los anticuerpos empleados. En la **Figura 31 B** se observa la señal nuclear específica de PCNA en dos secciones de tejido de cada genotipo. En las mamas tgAIB1 se encontró un mayor número de células marcadas. Por el contrario, el número de células teñidas con anticuerpos anti-PCNA fue menor en los cortes de tejido IGF-IR^{GMKO}. En concordancia con lo observado en las tinciones de mama completa, las mamas IGF-IR^{GMKO}/tgAIB1 presentaban un aumento considerable de células PCNA positivas respecto a los ratones IGF-IR^{GMKO}.

En la **Figura 31 C** se muestra la cuantificación de la señal de PCNA observada en la inmunohistoquímica. El aumento del índice proliferativo de células epiteliales de mamas IGF-IR^{GMKO}/tgAIB1 resultó estadísticamente significativo.

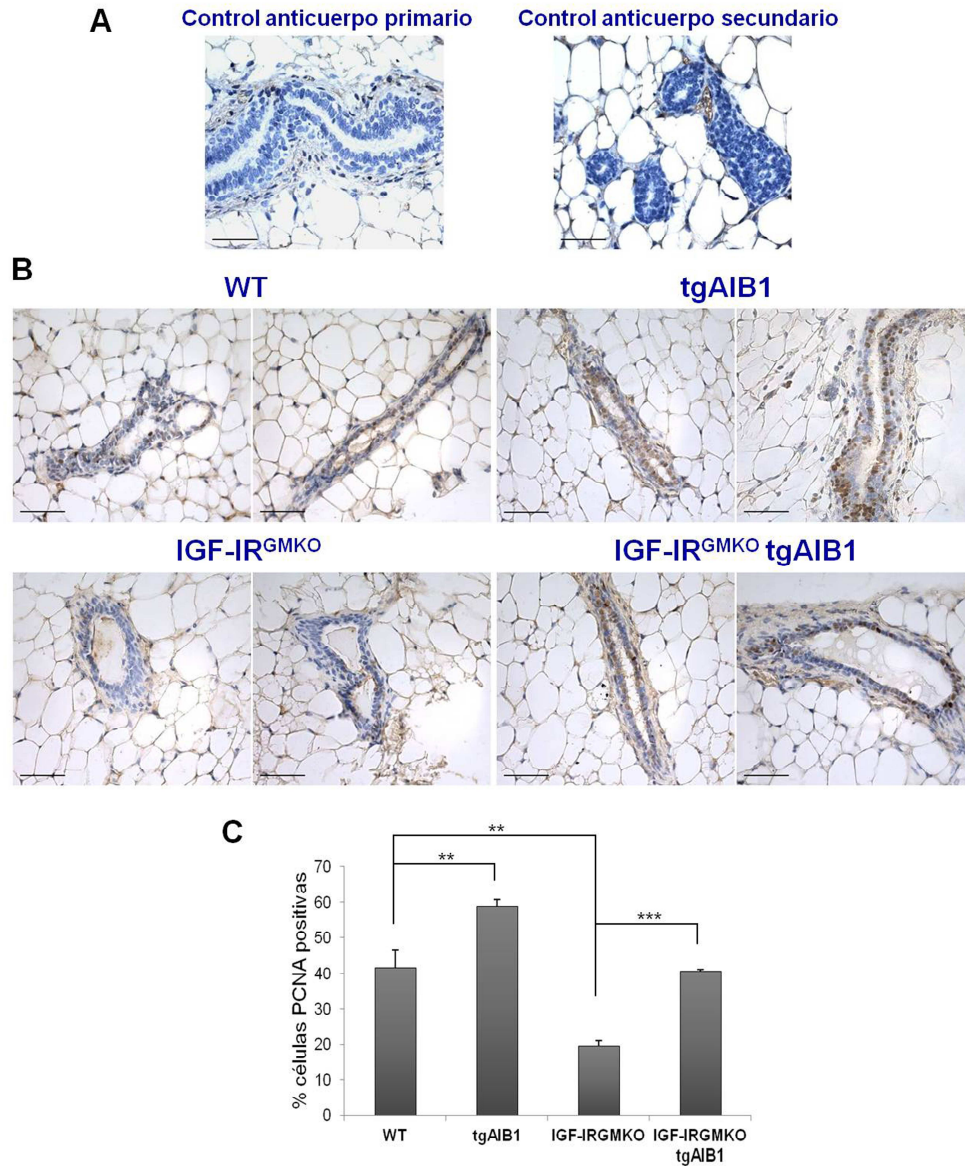


Figura 31. La sobreexpresión de AIB1 en el epitelio mamario deficiente en IGF-IR incrementa la proliferación celular. A) Inmunohistoquímica de los controles que demuestran la especificidad de anti-PCNA. En el control de anticuerpo primario se usó suero pre-inmune de ratón. En el control de anticuerpo secundario se ha omitido la incubación con anticuerpo primario. B) Inmunohistoquímica representativa de la expresión de PCNA en secciones de tejido de glándula mamaria en los distintos genotipos. Barra de escala: 50 μ m. C) Cuantificación de la expresión de PCNA. Se contó el número de células positivas en 10 campos de cada animal (100 células/campo). Las barras representan el valor medio de 3 ratones de cada genotipo \pm DE. (Diferencias significativas ** p <0.01, *** p <0.001 mediante test T de Student).

1.6. Análisis celular de la glándula mamaria de ratones WT, tgAIB1, IGF-IR^{GMKO}, IGF-IR^{GMKO}/tgAIB1.

1.6.1. Obtención de cultivo primario de células epiteliales de mama de ratón (MMEC, *Mouse Mammary Epithelial Cell*).

Para validar los resultados obtenidos a nivel morfológico e histológico, obtuvimos cultivos de células epiteliales derivadas de las glándulas mamarias de los 4 genotipos objeto de estudio (**Figura 32**).

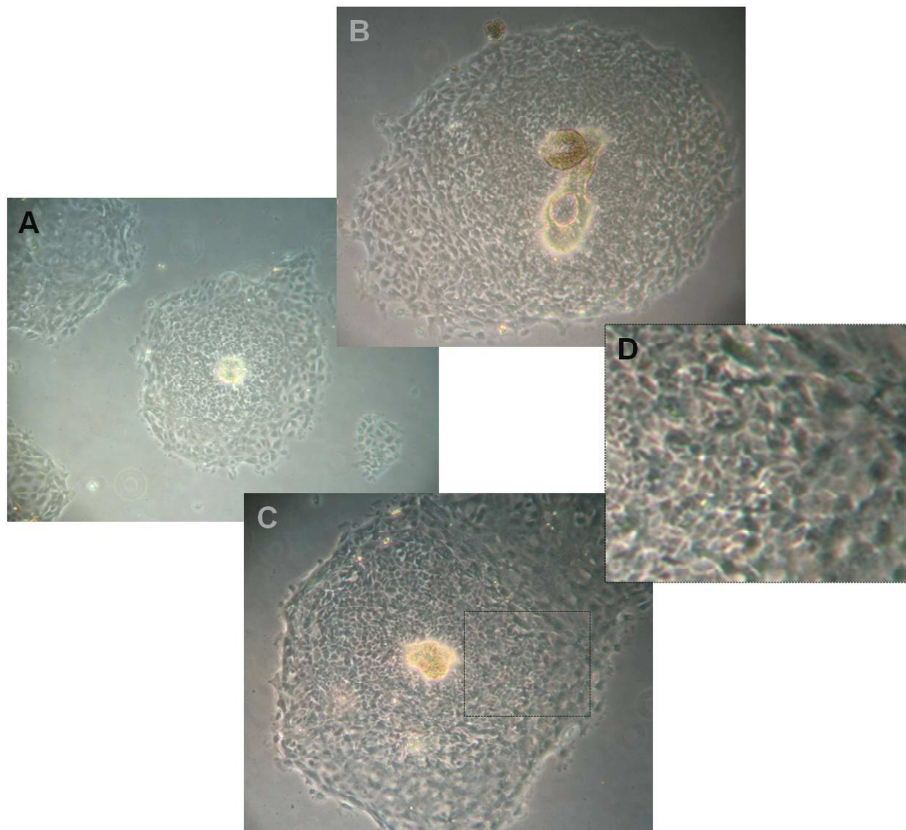


Figura 32. Cultivo primario de células epiteliales mamarias de ratón (MMEC). Las glándulas mamarias de hembras de 12-13 semanas de edad se disgregaron mecánica y enzimáticamente hasta obtener un pellet rico en organoides epiteliales que se sembraron en placas de cultivo con el medio de cultivo específico para MMEC. A) Visión global en la que se observan varias colonias independientes.

Figura 32 (continuación). Cultivo primario de células epiteliales mamarias de ratón (MMEC). B) Colonia de células epiteliales surgidas a partir de un organoide o fragmento de ducto situado en el centro. C) y D) La morfología celular de la colonia cambia a medida que prolifera el cultivo. Las células más jóvenes situadas en el centro mantienen la forma poligonal típica. Se aprecian perfectamente las uniones intercelulares estrechas u ocluyentes. Las imágenes se tomaron a los dos días de cultivo en un microscopio óptico invertido con contraste de fases.

Para ello se extirparon las mamas de hembras vírgenes y se procesaron según se describe en “Material y métodos”. En la **Figura 32** se muestran las colonias que se forman al sembrar los ductos disgregados u organoides. Posteriormente, se comprobó que estos cultivos de células epiteliales expresaban los transgenes descritos en el modelo animal, tanto a nivel de RNA como de proteína. En la **Figura 33 A** se muestra la detección del RNA de AIB1 y de Cre, junto con Gapdh como control positivo de la integridad del RNA. En paralelo, se preparó una reacción de RT-PCR que amplificaba los exones 2 a 5 del gen *Igf1r*. De este modo, se podía detectar si se había producido la delección del exón 3, ya que se obtendría un producto de menor tamaño tal y como se ha visto previamente en otros estudios que utilizaban el sistema Cre-loxP para eliminar el exón 3 de *Igf1r* (Cadoret et al. 2005; Holzenberger et al. 2000; Holzenberger et al. 2001; Kloting et al. 2008) . En las calles 3 y 4 (**Figura 33 A**) se observan dos tipos de RNA de *Igf1r*, uno en el que los exones 2 a 5 están íntegros, y otro de menor tamaño, en el que falta el exón 3. Por un lado, los cultivos de MMEC no siempre son puramente epiteliales, lo que significa que los fibroblastos o adipocitos que pudiera haber, contribuirían al aporte del RNA de *Igf1r* íntegro. Por otro lado, en consonancia con lo observado en el tejido, la expresión de Cre puede ser en mosaico.

El análisis de la expresión proteica de los diferentes cultivos mediante inmunotransferencia corroboró los resultados del análisis de RNA (**Figura 33 B**).

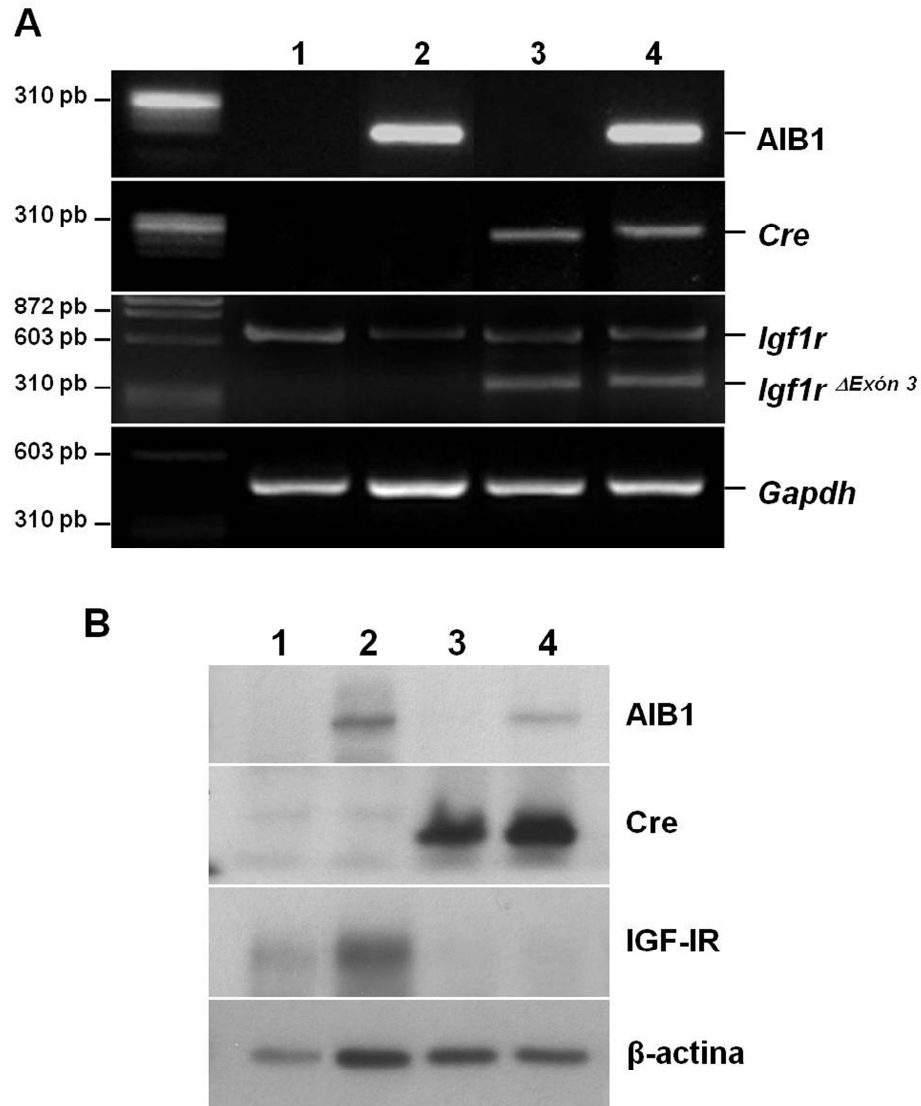


Figura 33. Comprobación de la expresión de los transgenes y de la delección de *Igf1r* en cultivos de MMEC. A) Se extrajo RNA de los cuatro cultivos de MMEC (uno por cada genotipo) a los 7 días de su aislamiento del tejido y se realizaron reacciones de RT-PCR para comprobar la expresión de los transgenes AIB1 y Cre, así como la pérdida del exón 3 de *Igf1r*. Como control de la integridad del RNA se usó *Gapdh*. B) Análisis de la expresión mediante inmunotransferencia de lisados proteicos pertenecientes a los mismos cultivos empleados para el estudio con RNA. Calle 1: WT; calle 2: tgAIB1; calle 3: IGF-IR^{GMKO}; calle 4: IGF-IR^{GMKO}/tgAIB1.

1.6.2. Estudio del ciclo celular en cultivo primario de células epiteliales de mama de ratón (MMEC).

Una vez demostrado que el cultivo de MMEC se comportaba como el tejido mamario en cuanto a expresión de AIB1 y de Cre, y que la delección de *Igf1r* se producía de igual modo, quisimos correlacionar la mayor proliferación observada en las mamas que sobreexpresan AIB1, con las distintas fases del ciclo celular. En la **Figura 34** se muestra el resultado obtenido en el análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo de cultivos de MMEC procedentes de los 4 genotipos indicados.

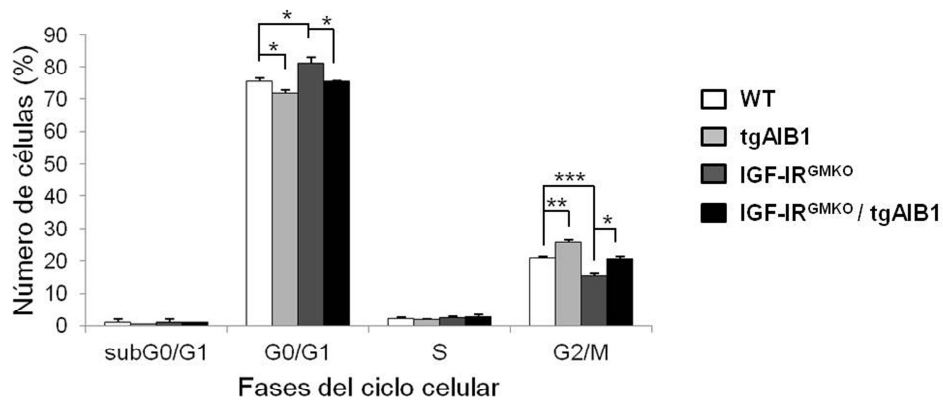


Figura 34. La sobreexpresión de AIB1 en células epiteliales mamarias deficientes en IGF-IR promueve el aumento de la proliferación celular. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo de células MMEC teñidas con yoduro de propidio. La gráfica representa los valores medios obtenidos de 3 muestras independientes \pm DE. (Diferencias significativas * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ mediante test T de Student).

1.7. Validación de los resultados obtenidos con el modelo animal en una línea celular humana.

Para finalizar el estudio sobre el efecto de la sobreexpresión de AIB1 en mamas deficientes en IGF-IR, quisimos comprobar qué ocurría en una línea celular humana en lugar de murina. Para ello, elegimos la línea celular HMEC (*Human Mammary Epithelial Cell*), la cual se compone de células epiteliales de mama humanas, no tumorales. Para empezar, tuvimos que simular las mismas condiciones que en el modelo animal, es decir, sobreexpresión de AIB1 y delección de IGF-IR. En la **Figura 35** se muestra la estrategia utilizada para conseguir los cuatro tipos de células que nos interesaban.

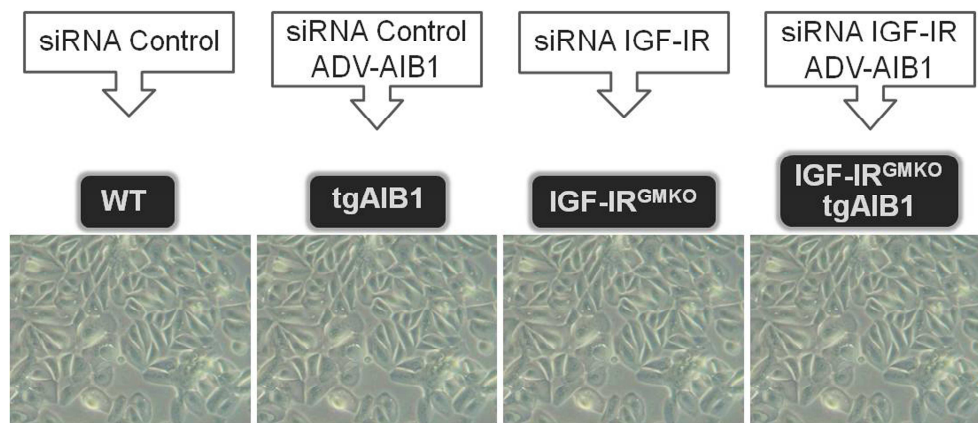


Figura 35. Diferentes tratamientos realizados a las células humanas HMEC para obtener cuatro tipos celulares distintos. La línea deficiente en IGF-IR se consiguió transfectando a las células siRNA para el gen IGF-IR humano. Al resto de cultivos se les transfectó siRNA Control. La sobreexpresión de AIB1 se obtuvo infectando las células con adenovirus que producen la sobreexpresión de AIB1. Imagen de células HMEC en cultivo, tomadas con un microscopio óptico invertido.

Las células HMEC se transfectaron con siRNA (*small interfering RNA*) específico del gen IGF-IR y posteriormente se infectaron con adenovirus conteniendo a AIB1 (ADV-AIB1) para producir su sobreexpresión, según se

describe en “Material y métodos”. Como comprobación se analizó la expresión de AIB1 e IGF-IR mediante inmunotransferencia (**Figura 36 A**). La infección con adenovirus produjo una sobreexpresión moderada de AIB1, pero similar a la observada en los ratones transgénicos. El silenciamiento de IGF-IR fue muy efectivo, no se observándose prácticamente proteína en las calles 2 y 4.

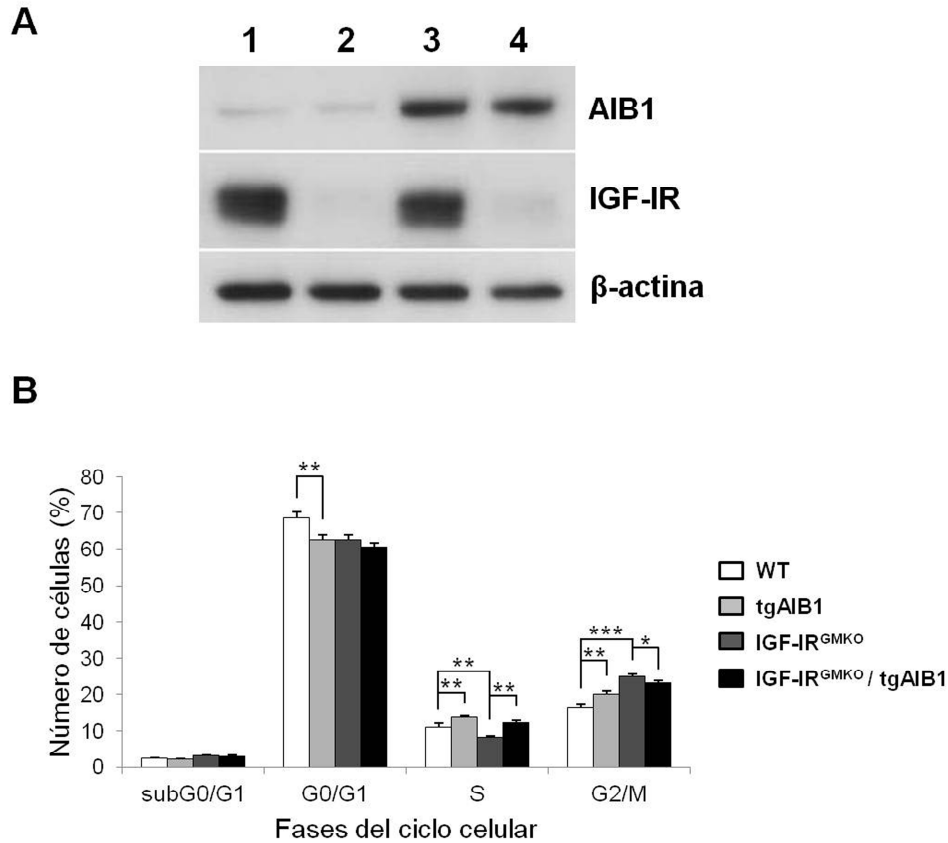


Figura 36. La sobreexpresión de AIB1 en células epiteliales mamarias humanas (HMEC) deficientes en IGF-IR produce un aumento de la fase S del ciclo celular. A) Transfección con siRNA para IGF-IR e infección con ADV-AIB1 y posterior análisis por inmunotransferencia. Se utilizó β -actina como control de carga. Calle 1: WT; calle 2: IGF-IR^{GMKO}; calle 3: tgAIB1; calle 4: IGF-IR^{GMKO}/tgAIB1. B) Análisis del ciclo celular por citometría de flujo de células teñidas con yoduro de propidio. La gráfica representa los valores medios obtenidos de 3 muestras independientes \pm DE. (Diferencias significativas * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ mediante test T de Student).

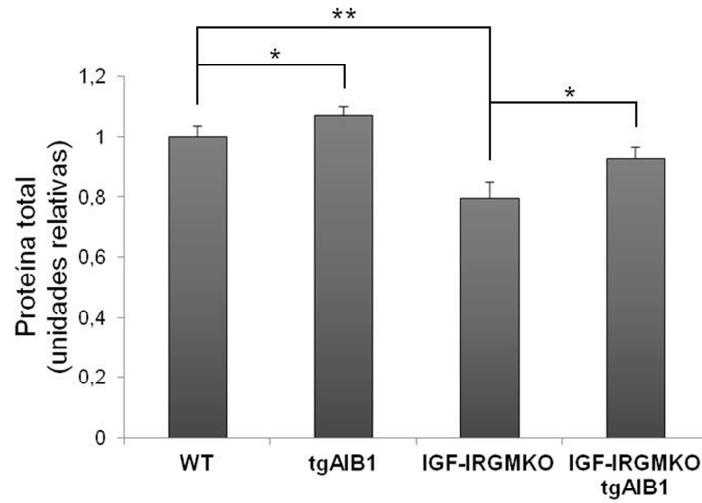
Tras la puesta a punto de las condiciones de transfección e infección con adenovirus de células HMEC, analizamos el ciclo celular de estas células mediante citometría de flujo, tal y como habíamos hecho con las MMEC. Como cabía esperar, en las células tgAIB1 las fases S y G2/M se vieron incrementadas en detrimento de la fase G0/G1 (**Figura 36 B**, compárese tgAIB1 con WT). En cambio, las células deficientes en IGF-IR (IGF-IR^{GMKO}) mostraron un perfil anómalo de ciclo celular. Tenían menor proporción de células en fase G0/G1 que las WT y mayor G2/M incluso que las células tgAIB1. Los datos del cultivo *in vitro* de células epiteliales parecían indicar que las células deficientes en IGF-IR no veían perjudicado su crecimiento, si bien la disminución de eventos en la fase S no concordaba con que estuvieran más proliferativas. El cultivo IGF-IR^{GMKO}/tgAIB1 también presentaba una proporción celular en G2/M anormalmente elevada (aunque menor que en las células IGF-IR^{GMKO}), pero la fase S era más parecida a los WT y tgAIB1.

Los resultados de los 3 experimentos en triplicado realizados para analizar por citometría de flujo las células HMEC no se correspondían con lo que observamos a nivel microscópico en cada uno de ellos. En cada ocasión, justo antes de despegar las células de la placa de cultivo, observamos los cuatro cultivos al microscopio y la imagen obtenida fue siempre la misma: el cultivo con IGF-IR silenciado (IGF-IR^{GMKO}) era el que mostraba menor confluencia celular y el cultivo infectado con ADV-AIB1 (tgAIB1) era el que había proliferado más. Entre las células WT y las IGF-IR^{GMKO}/tgAIB1 no se apreciaban cambios significativos. Por este motivo, se decidió repetir los experimentos de silenciamiento e infección para analizar la proliferación celular con otras aproximaciones metodológicas. En la **Figura 37 A** se muestra la cuantificación de proteína total obtenida en cada tipo de cultivo HMEC. La **Figura 37 B** representa un ensayo colorimétrico MTT el cual permite medir la proliferación y supervivencia celulares.

Las dos aproximaciones empleadas son complementarias y en ambas se obtuvieron resultados concordantes: tomando al cultivo WT como control, las células tgAIB1 son las que más proliferaron frente a las IGF-IR^{GMKO} que fueron las

que menos. Las células IGF-IR^{GMKO}/tgAIB1 recuperaron el índice proliferativo causado por el silenciamiento de IGF-IR.

A



B

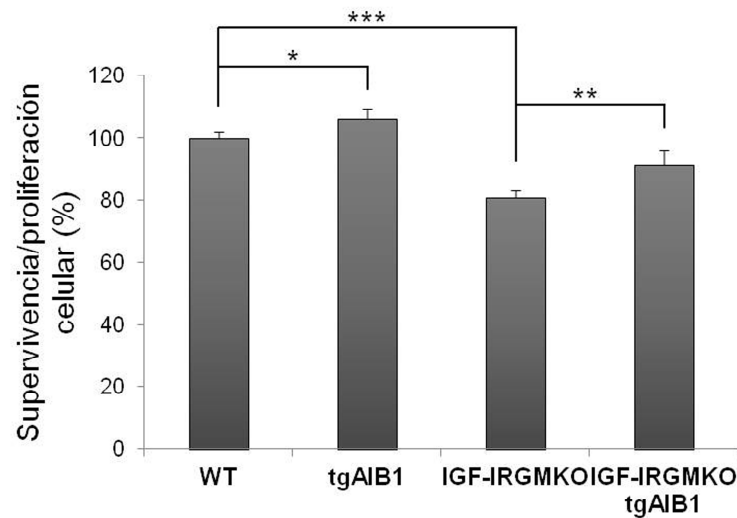


Figura 37. El silenciamiento de IGF-IR en células HMEC reduce la proliferación celular y este efecto es revertido por la sobreexpresión de AIB1. A) Las células HMEC se transfectaron con siRNA para IGF-IR y se infectaron con ADV-AIB1. A los 3 días de la transfección se recogieron todas las células (incluso las flotantes) y se lisaron para cuantificar los niveles de proteína total. La gráfica muestra los valores medios de proteína \pm DE relativos al cultivo WT obtenidos de 3 experimentos independientes. B) Ensayo MTT en cultivos de HMEC transfectados e infectados como en el apartado A. La gráfica representa el porcentaje de supervivencia/proliferación celular medio \pm DE relativo al cultivo WT. (Diferencias significativas * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 mediante test T de Student).

Una posible explicación para la discrepancia de resultados obtenidos en la citometría de flujo y en el ensayo MTT era que las células deficientes en IGF-IR (IGF-IR^{GMKO}) se quedaran detenidas en la fase G2 del ciclo celular. Esto explicaría el alto porcentaje de células en fase G2/M (**Figura 36 B**) y a la vez la escasa proliferación celular mostrada en la **Figura 37**. Para demostrar esta hipótesis, utilizamos los lisados proteicos obtenidos tras el silenciamiento de IGF-IR y la infección con ADV-AIB1 mostrados en la **Figura 37 A** para comprobar mediante inmunotransferencia los niveles de ciclina B1, proteína necesaria para la progresión del ciclo celular de G2 a M.

En la **Figura 38** se observa que efectivamente los cultivos HMEC deficientes en IGF-IR presentaron mayor expresión de ciclina B1 que los cultivos WT y tgAIB1, siendo este efecto menos pronunciado en las células IGF-IR^{GMKO}/tgAIB1. Para demostrar que los niveles elevados de ciclina B1 se correspondían con células con un ciclo celular detenido, y que realmente la proliferación aumentaba con la sobreexpresión de AIB1 (incluso en ausencia de IGF-IR), se analizaron en paralelo los niveles de PCNA y de AKT fosforilado (p-AKT), como indicadores de proliferación y de supervivencia celular.

Como era de esperar, la máxima expresión de PCNA y de p-AKT la presentaron las células tgAIB1, en concordancia con el mayor porcentaje de supervivencia/proliferación celular mostrado en la **Figura 37 B**. La cantidad de PCNA y de p-AKT se redujo en las células IGF-IR^{GMKO}, corroborando que pese a lo que pudiera parecer en la citometría de flujo, el déficit de IGF-IR producía un descenso en la proliferación celular. Por último, de forma similar a lo observado en las células de ratón (MMEC), la sobreexpresión de AIB1 en células deficientes en IGF-IR (cultivo IGF-IR^{GMKO}/tgAIB1) provocó una recuperación en la proliferación celular, coincidiendo con el aumento de la expresión de PCNA y p-AKT (**Figura 38**).

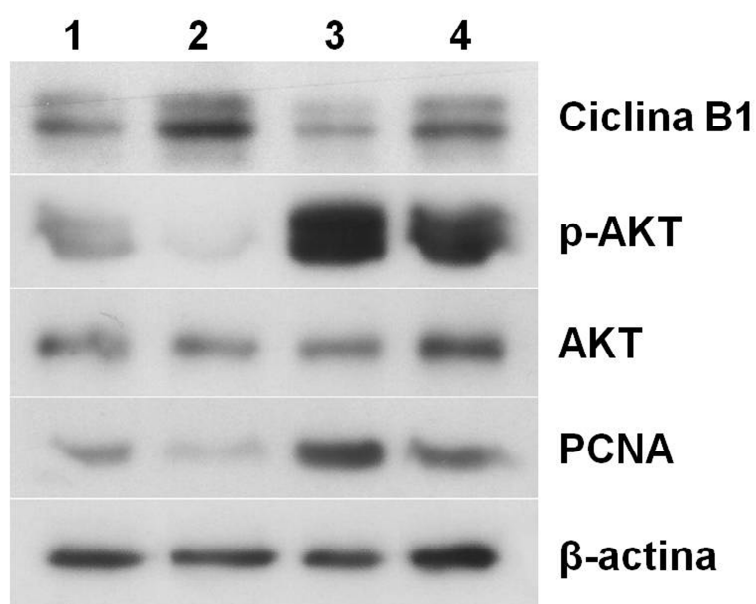


Figura 38. El silenciamiento de IGF-IR en células HMEC provoca la detención del ciclo celular en fase G2. La sobreexpresión de AIB1 vuelve a activar el ciclo aumentando la proliferación celular. Transfección con siRNA para IGF-IR e infección con ADV-AIB1 y posterior análisis por inmunotransferencia. Se utilizó β-actina como control de carga y AKT como control de expresión de AKT total (fosforilado y no fosforilado). Calle 1: WT; calle 2: IGF-IR^{GMKO}; calle 3: tgAIB1; calle 4: IGF-IR^{GMKO}/tgAIB1.

2. Estudio de la actividad angiogénica promovida por AIB1 en la glándula mamaria.

Nuestro modelo animal así como otros modelos han contribuido a definir la función de AIB1 a lo largo de la progresión tumoral, desde la hiperplasia hasta la metástasis. Con objeto de identificar posibles mecanismos a través de los cuales AIB1 induce la progresión tumoral, nos centramos en el proceso de angiogénesis. La angiogénesis o creación de nuevos vasos sanguíneos es imprescindible para que el tumor pueda extenderse cuando excede los 2 mm de diámetro, ya que no recibe suficientes nutrientes por simple difusión. Debido a la falta de oxigenación (hipoxia) se liberan factores de crecimiento de la familia de VEGF, que actúan a través de receptores como VEGFR1 y VEGFR2 promoviendo el crecimiento del endotelio hacia el tumor. VEGFR2 presenta mayor relevancia en la angiogénesis promovida por VEGF y su activación se ha detectado en células epiteliales de mama tumorales en las que actúa como mitógeno (Weigand et al. 2005). Por otra parte, debido a que la glándula mamaria es un órgano que sufre procesos de crecimiento e involución en el desarrollo postnatal, se ha visto que existe una regulación de VEGF y sus receptores en roedores durante pubertad, embarazo, lactancia e involución (Pepper et al. 2000).

Hasta la fecha, no se había relacionado a AIB1 con angiogénesis (evento necesario para la progresión tumoral), sin embargo sí que se había visto que coactivaba la expresión de la metaloproteasa MMP-1, implicada en la remodelación de la matriz extracelular, favoreciendo la invasión de tejidos colindantes, y finalmente en metástasis (Goel and Janknecht 2004). Esta asociación con metástasis y datos previos obtenidos en nuestro grupo nos hicieron pensar que AIB1 podía estar promoviendo angiogénesis en la glándula mamaria a través de la regulación de VEGF/VEGFR2. En primer lugar, habíamos observado una mayor vascularización de las mamas tgAIB1 durante la disección del tejido. En segundo lugar, el uso de un *array* de anticuerpos fosfoespecíficos de varios receptores tirosina quinasa, reveló un incremento en los niveles de activación de

VEGFR2 en el epitelio mamario de los ratones *MMTV-AIB1^{+/-}* (tgAIB1) *versus* *MMTV-AIB^{-/-}* (WT).

2.1. Análisis de la expresión de VEGF y VEGFR2 en glándulas mamarias de ratones WT y tgAIB1.

Para comprobar si la sobreexpresión de AIB1 en la GM aumentaba la expresión de VEGF y/o VEGFR2 en la GM, realizamos una reacción de RT-PCR semicuantitativa con RNA extraído de mamas de hembras vírgenes WT y tgAIB1 de 4 semanas de edad. Los niveles de expresión de estos dos genes se relativizaron a su expresión en WT. No encontramos diferencias significativas en los niveles de expresión de VEGF. Sin embargo, la expresión de VEGFR2 aumentó significativamente en las mamas de ratones tgAIB1 (**Figura 39**).

2.2. Estudio *in vivo* de la angiogénesis en la glándula mamaria de ratones tgAIB1/VEGFR2-Luc.

Tras observar que los ratones tgAIB1 expresaban en la GM mayores niveles de VEGFR2 que los ratones WT, quisimos validar estos resultados en un modelo animal diseñado para el estudio de angiogénesis *in vivo*. (Zhang et al. 2004). Los ratones transgénicos *VEGFR2-Luciferasa* (Xenogen) contienen el gen reportero luciferasa bajo el control del promotor del gen VEGFR2 murino, lo que permite medir la actividad luciferasa como indicativo de angiogénesis. Este modelo animal se utiliza para monitorizar la expresión *in vivo* de VEGFR2 y correlacionar ésta con distintos tratamientos. En nuestro caso, queríamos comprobar el efecto que causa la sobreexpresión de AIB1 en el tejido mamario.

Cruzamos los ratones *VEGFR2-Luciferasa^{+/+}* con nuestros ratones *MMTV-AIB1^{+/-}* para obtener ratones *MMTV-AIB1^{+/-}/VEGFR2-Luciferasa^{+/-}* que sobreexpresan AIB1 en la GM y son portadores del gen de la luciferasa, así como ratones control *MMTV-AIB1^{-/-}/VEGFR2-Luc^{+/-}* (WT/*VEGFR2-Luc^{+/-}*) (**Figura 40**).

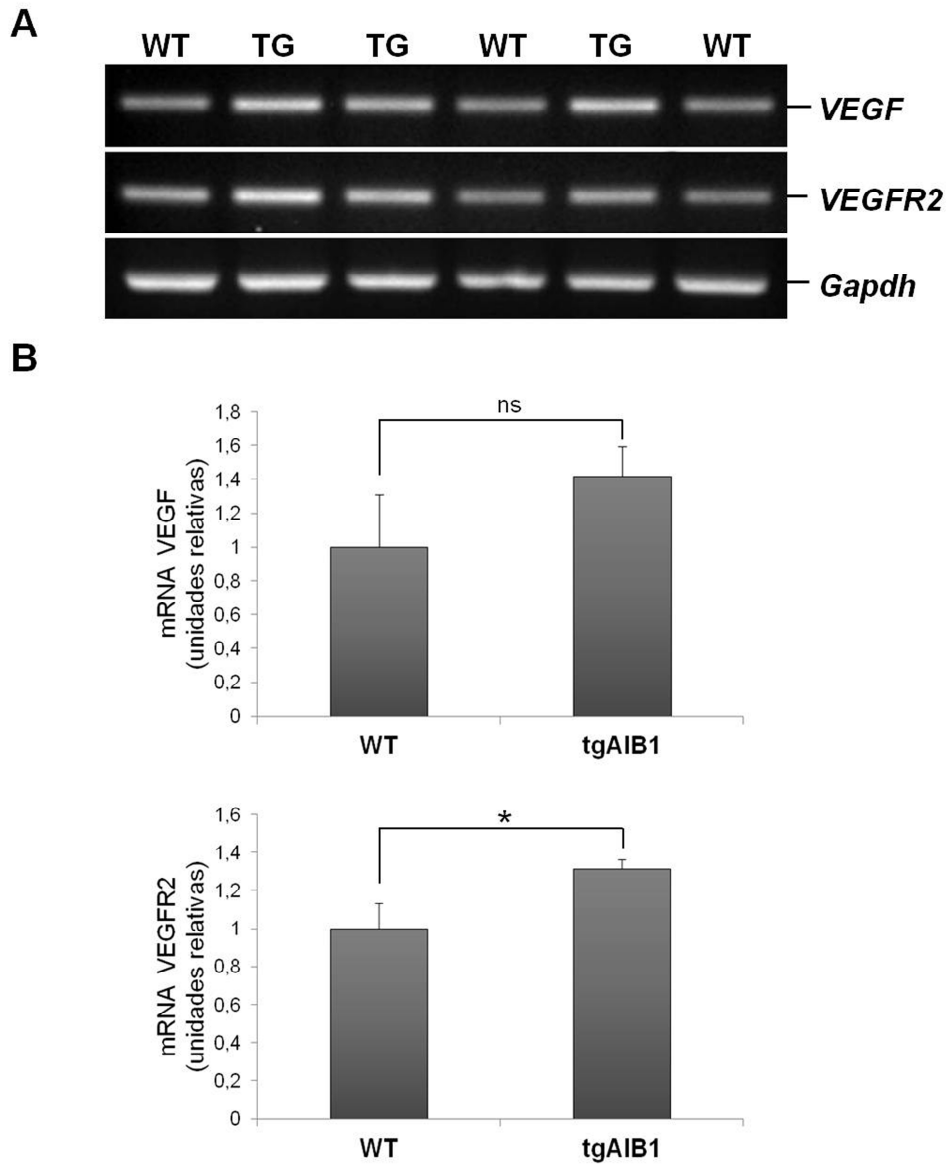


Figura 39. La sobreexpresión de AIB1 en la glándula mamaria aumenta la expresión de VEGFR2. A) Análisis de la expresión de VEGF y VEGFR2 por RT-PCR semicuantitativa de RNA extraído de GM de hembras vírgenes WT y tgAIB1 de 4 semanas de edad (n=3 de cada genotipo). La expresión de Gapdh se usó como control. B) Cuantificación de la intensidad de las bandas observadas en el gel de agarosa mediante el programa Quantity One (Bio-Rad), normalizada a los niveles de Gapdh. Las barras representan los niveles medios de expresión \pm DE relativos al valor del genotipo WT. (Diferencias significativas * $p < 0.05$ mediante test T de Student).

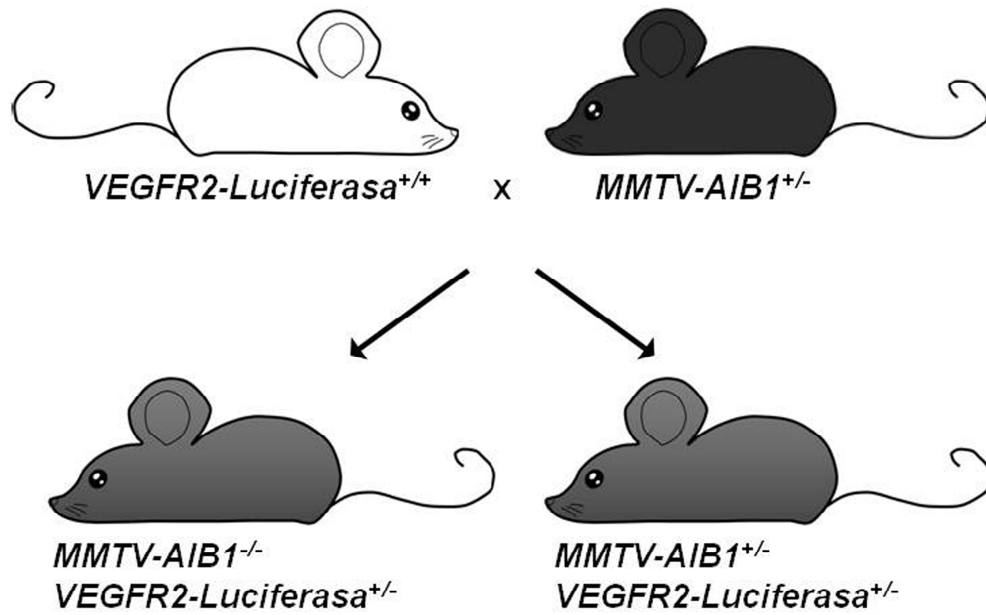
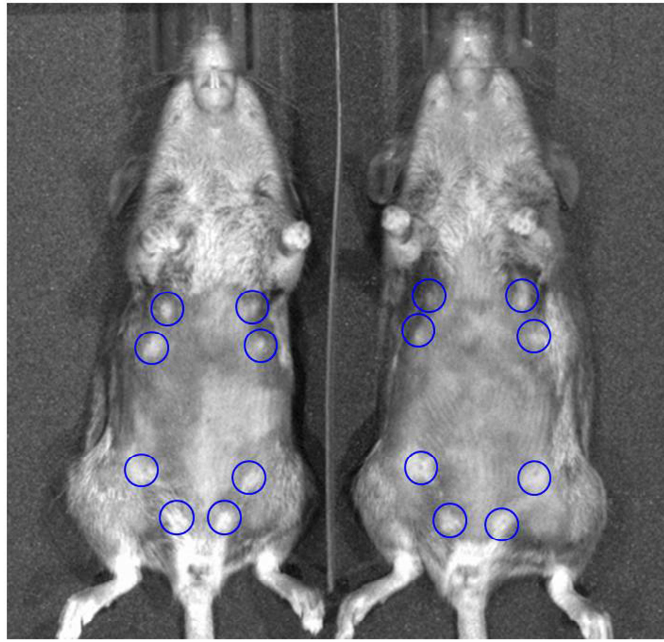


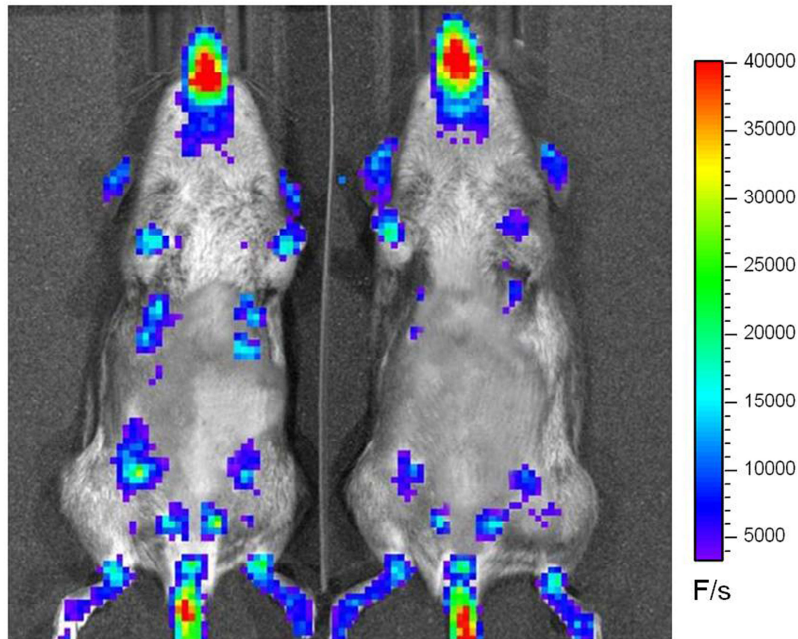
Figura 40. Estrategia de cruces realizados para obtener los dos genotipos necesarios para el estudio. Ratones *VEGFR2-Luciferasa*^{+/+} que expresan el gen de la luciferasa bajo el control del promotor del gen VEGFR2 murino, se cruzaron con ratones *MMTV-AIB1*^{+/-} en los que el gen AIB1 humano se sobreexpresa en la glándula mamaria. De este cruce se obtuvieron tanto los ratones objeto de estudio (*VEGFR2-Luciferasa*^{+/-}/*MMTV-AIB1*^{+/-}) como los ratones control (*VEGFR2-Luciferasa*^{+/-}).

Una vez obtenidos los ratones doble transgénicos, evaluamos la activación de VEGFR2 *in vivo*, inyectando intraperitonealmente luciferina (sustrato de la luciferasa) a hembras vírgenes de 4 y 7 semanas de edad (al inicio y durante la pubertad), y posteriormente midiendo la señal lumínica generada en las glándulas mamarias mediante un analizador biofotónico de imagen (Xenogen) (**Figura 41**).

A **tgAIB1/VEGFR2-Luc** **WT/VEGFR2-Luc**



B **tgAIB1/VEGFR2-Luc** **WT/VEGFR2-Luc**



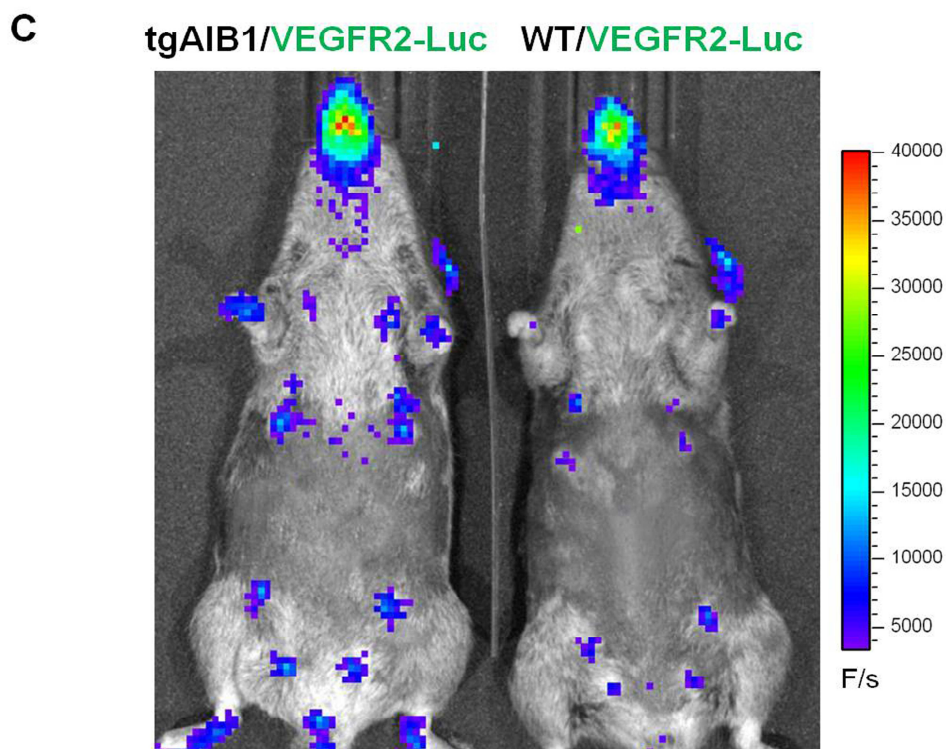


Figura 41. La expresión de AIB1 en la glándula mamaria promueve la activación de VEGFR2. A) Imagen de hembras de 4 semanas de edad (visión ventral). Los círculos indican la localización del pezón de las glándulas mamarias visibles tras el afeitado de los animales, a excepción del par cervical. B-C) Ratones tgAIB1/VEGFR2-Luc y WT/VEGFR2-Luc (n=3) de 4 semanas de edad (B) y de 7 semanas de edad (C), se fotografiaron mediante el analizador biofotónico de imagen IVIS Imaging System 50 (Xenogen) como se describe en la sección "Material y métodos". La escala de color representa la señal bioluminiscente emitida por cada animal y medida en fotones/segundo. Las glándulas mamarias del ratón que sobreexpresa AIB1 (izquierda) presentan una mayor intensidad lumínica, lo que se traduce en una mayor activación del promotor del gen VEGFR2.

A las 4 semanas de edad (**Figura 41 B**) se detectó mayor actividad luciferasa en el tejido mamario de las hembras tgAIB1 indicando que existía una activación del promotor de VEGFR2 aumentada. A las 7 semanas de edad (**Figura 41 C**) la señal lumínica era más tenue, pero seguía siendo mayor en las hembras que sobreexpresaban AIB1 en la GM. Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de AIB1 incrementó el proceso de angiogénesis en la GM.

El hecho de que a las 7 semanas de edad la señal lumínica fuera más tenue que a las 4 semanas, guarda relación con el hecho de que en el inicio de la pubertad el proceso de angiogénesis está más activo, y esto ha sido observado en el modelo animal VEGFR2-Luc (Zhang et al. 2004). Por otra parte, el uso de ratones descendientes de la mezcla de las cepas FVB (VEGFR2-Luc) y C57BL/6J (tgAIB1) también podría explicar que la señal lumínica observada no fuera tan intensa como debiera. Los estudios realizados con el modelo VEGFR2-Luc suelen realizarse aplicando un tratamiento o lesionando un tejido y midiendo la activación de VEGFR2, con lo que el fondo genético FVB se mantiene. Por indicaciones de los técnicos de Xenogen, todas las hembras empleadas en este estudio tuvieron que ser afeitadas por la parte ventral para poder medir la actividad luciferasa en el analizador biofotónico, debido a que su color de piel era más oscuro que en un ratón FVB.

2.3. Análisis tisular de la angiogénesis promovida por AIB1 en la GM de ratones tgAIB1/VEGFR2-Luc.

Con objeto de confirmar los resultados observados en el estudio *in vivo*, decidimos medir la actividad luciferasa en lisados proteicos obtenidos de la GM de ratones WT/VEGFR2-Luc y tgAIB1/VEGFR2-Luc. Como se muestra en la **Figura 42**, a las 7 semanas de edad la actividad luciferasa fue menor que a las 4 semanas, en concordancia con lo observado *in vivo* (**Figura 41**). En la GM de los ratones tgAIB1/VEGFR2-Luc se detectó un incremento de la actividad luciferasa, sugiriendo que la sobreexpresión de AIB1 estaba activando, directa o indirectamente, el promotor de VEGFR2 y por ende, la proliferación del epitelio. También es posible que la sobreexpresión de AIB1 promueva la secreción de factores que activen la proliferación del endotelio.

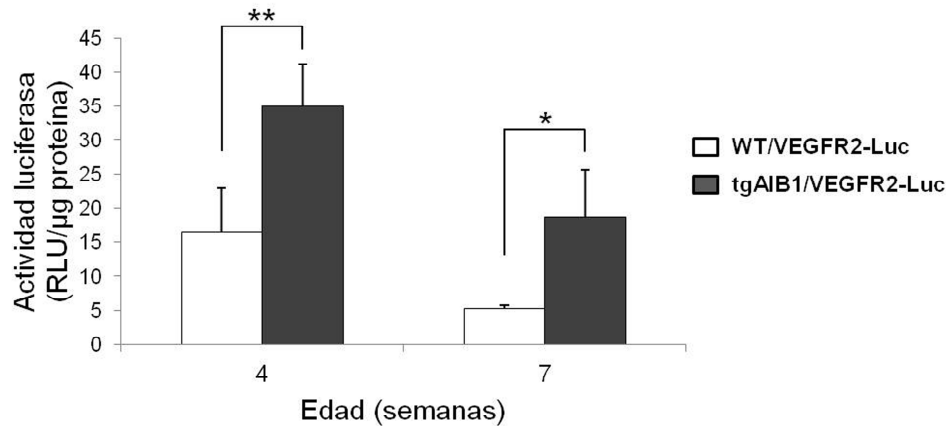


Figura 42. La sobreexpresión de AIB1 en la mama de ratones tgAIB1/VEGFR2-Luc produce un aumento de la actividad luciferasa a las 4 y a las 7 semanas de edad. La cuarta GM (abdominal izquierda) de hembras WT/VEGFR2-Luc y tgAIB1/VEGFR2-Luc de 4 y 7 semanas de edad se homogeneizaron en tampón de lisis PLB (Promega). Tras varias centrifugaciones en frío para eliminar los restos celulares y el exceso de grasa, se calculó la concentración proteica mediante el método de Bradford y se midió la actividad luciferasa en 50 μ l de lisado utilizando un luminómetro (Berthold Detection Systems). Los valores obtenidos se expresan como unidades relativas de luciferasa (RLU, *Relative Units of Luciferase*) por cada μ g de proteína total. Las barras representan el valor medio de actividad luciferasa \pm DE. n=8 WT/VEGFR2-Luc y tgAIB1/VEGFR2-Luc (4 semanas); n=6 WT/VEGFR2-Luc y tgAIB1/VEGFR2-Luc (7 semanas). (Diferencias significativas *p<0.05, **p<0.01, mediante test T de Student).

Con objeto de apoyar los resultados obtenidos en el ensayo de activación del promotor de VEGFR2, quisimos demostrar que la sobreexpresión de AIB1 producía un aumento en la expresión de genes relacionados con proliferación y angiogénesis. Para ello extrajimos RNA de mamas WT/VEGFR2-Luc y tgAIB1/VEGFR2-Luc de 4 y 7 semanas de edad y analizamos la expresión de VEGF, VEGFR1 y VEGFR2 por RT-PCR en tiempo real (**Figura 43**).

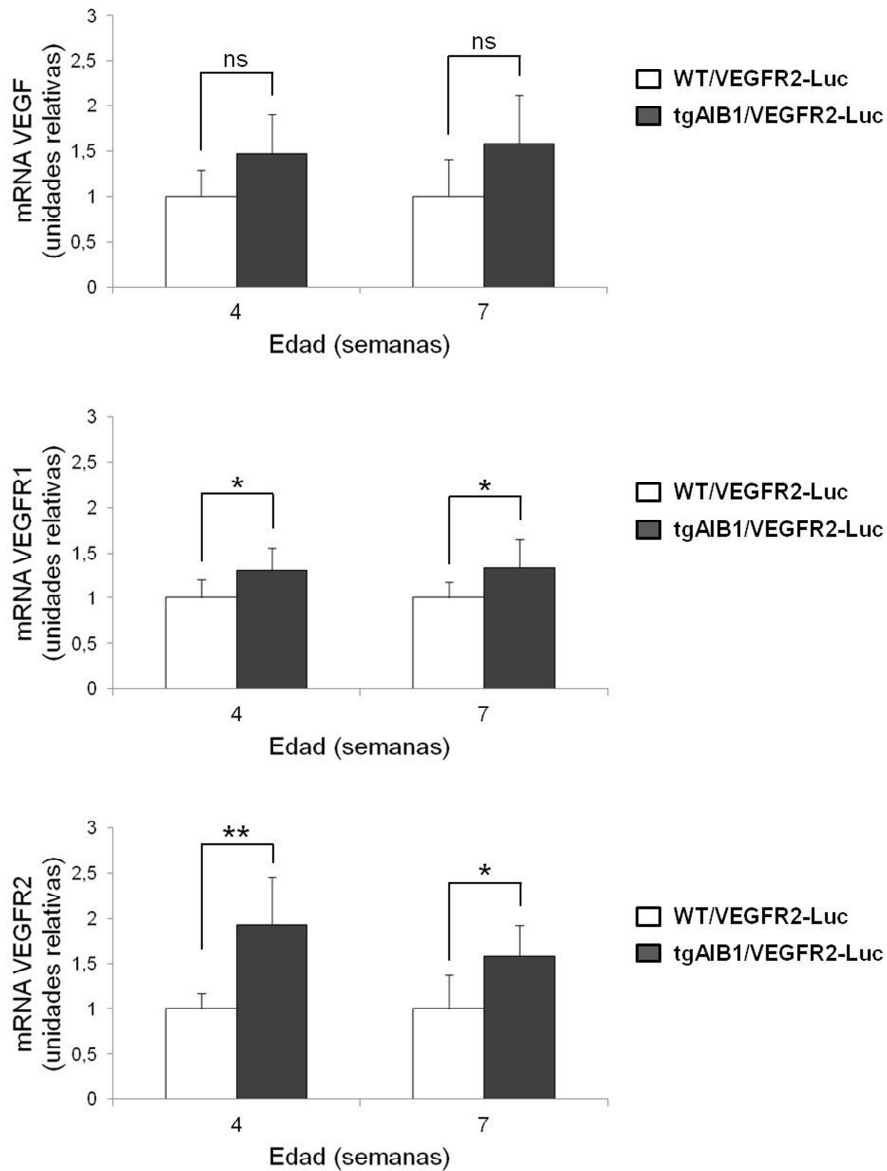


Figura 43. AIB1 promueve la expresión de VEGFR1 y VEGFR2 en la glándula mamaria al inicio y durante la pubertad. Análisis de la expresión de VEGF, VEGFR1 y VEGFR2 por RT-PCR en tiempo real de RNA extraído de la novena GM (inguinal derecha) de hembras vírgenes de 4 y 7 semanas de edad (n=6 WT/VEGFR2-Luc y tgAIB1/VEGFR2-Luc). La cuantificación de los niveles de expresión se realizó marcando el cDNA con el fluoróforo específico de ADN Sybr Green en un equipo de PCR en tiempo real Lightcycler 480 (Roche). Las barras representan los niveles medios de expresión \pm DE normalizados frente a GAPDH y relativos al valor del genotipo WT. (Diferencias significativas * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, mediante test T de Student).

Las diferencias encontradas en la expresión de VEGF resultaron no significativas. Sin embargo, la expresión de VEGFR2 sí que aumentó en las mamas tgAIB1/VEGFR2-Luc a las 4 y a las 7 semanas de edad, confirmando lo observado previamente en la reacción de RT-PCR semicuantitativa (**Figura 39**). También encontramos un aumento significativo de la expresión de VEGFR1 en las mamas tgAIB1/VEGFR2-Luc a las dos edades analizadas. Este receptor tiene menor protagonismo en el proceso de angiogénesis mediado por VEGF que el receptor VEGFR2, sin embargo se ha descrito que participa en la supervivencia de las células endoteliales a través de la activación por VEGF de la ruta PI3K/AKT (Cai et al. 2003).



DISCUSIÓN

La glándula mamaria es un órgano en constante evolución postnatal. Debido a su función temporal de producción de leche después del parto, las estructuras que la componen están sometidas a un continuo remodelado. En la pubertad, donde existen variaciones durante cada ciclo menstrual, en el embarazo, cuando se empiezan a desarrollar las estructuras que preparan a la glándula secretora, y en la lactancia, cuando se alcanza el máximo desarrollo. Tras este ciclo natural, la glándula mamaria debe volver a su estado inicial y el tejido adiposo recupera el espacio cedido por la involución de las estructuras lóbulo-alveolares (Lund et al. 1996). Por lo tanto, la proliferación, apoptosis y diferenciación de las estructuras epiteliales que forman parte de la glándula mamaria, y las interacciones entre este epitelio y el tejido conectivo que lo rodea, son procesos que deben estar estrictamente regulados. En un órgano tan dinámico, errores en el control de cualquiera de estas funciones fisiológicas pueden dar lugar a procesos patológicos como el cáncer.

AIB1 es un coactivador de receptores esteroideos y de otros factores de transcripción que ha sido reconocido como oncogén en cáncer de mama por su amplificación y sobreexpresión en tumores mamarios (Anzick et al. 1997) y por la formación de tumores en modelos animales que sobreexpresan AIB1 (Torres-Arzayus et al. 2004). Además, la delección de AIB1 en el ratón redujo la tumorigénesis provocada por otros oncogenes y carcinógenos (Kuang et al. 2004; Kuang et al. 2005).

AIB1 se ha relacionado con la iniciación tumoral pero distintos estudios a lo largo de estos años han demostrado que también participa en la progresión del tumor, facilitando la transcripción de genes implicados en los mecanismos de invasión (Yoshida et al. 2005) y metástasis como la transcripción de la metaloproteasa MMP-1 (Goel and Janknecht 2004) y MMP-2 y MMP-13 (Yan et al. 2008). En un estudio con *arrays* de expresión, AIB1 ha sido detectado en el compartimento estromal de tumores de mama, sugiriendo una nueva función patológica en el estroma, además de las ya conocidas en células epiteliales (Finak et al. 2008). Con objeto de identificar posibles mecanismos a través de los cuales AIB1 induce progresión tumoral, decidimos estudiar el papel que desempeña AIB1

en angiogénesis. La formación de nuevos vasos sanguíneos es un requisito indispensable para la supervivencia del tumor, además de la progresión a metástasis. Nuestros ratones transgénicos para AIB1 (tgAIB1), que sobreexpresan de forma moderada la variante humana de AIB1 en el epitelio de la glándula mamaria (GM), producen una hiperplasia en este tejido sin llegar a desarrollar lesiones neoplásicas (Avivar et al. 2006), hecho que convierte a estos ratones en un modelo animal muy adecuado para el estudio de los eventos que suceden previos al inicio del tumor.

El factor de crecimiento endotelial VEGF y su receptor VEGFR2 juegan un papel fundamental en la angiogénesis. La sobreexpresión de AIB1 en la GM de hembras vírgenes tgAIB1 aumentó los niveles de expresión de VEGFR2 comparados con los de la GM silvestre (WT). Sin embargo no encontramos diferencias significativas en los niveles de expresión de VEGF. En cambio, otros estudios han encontrado que la deficiencia de AIB1 provoca una disminución de los niveles de VEGF. Por un lado, la deficiencia de AIB1 en ratones (SRC-3^{+/-}) produjo una disminución de la inmunodetección de VEGF en los microcapilares de secciones de tejido granular, comparada con la de tejidos de ratones SRC-3^{+/+} (Al-Otaiby et al. 2012). Por otro lado, en un modelo de cáncer de tiroides deficiente en AIB1 (TRβ^{PV/PV}SRC-3^{-/-}) el nivel de expresión del mRNA de VEGF en la tiroides se redujo un 40% comparado con el de ratones TRβ^{PV/PV}SRC-3^{+/+}, sugiriendo que la deficiencia de AIB1 podría reprimir la expresión de VEGF (Ying, Willingham, Cheng 2008). Estos resultados los quisimos validar *in vivo* cruzando nuestro modelo de ratón con el modelo transgénico VEGFR2-Luciferasa (VEGFR2-Luc) (Zhang et al. 2004). Estos ratones expresan el gen luciferasa bajo el control del promotor de VEGFR2, lo que permite monitorizar y cuantificar la expresión *in vivo* de VEGFR2 y correlacionarla con la activación del proceso de angiogénesis.

Los resultados *in vivo* e *in vitro* de estos cruces sugieren que la sobreexpresión de AIB1 activa la transcripción de VEGFR2, hecho que justificaría la mayor proliferación y supervivencia del epitelio. De acuerdo con estos resultados se ha visto que VEGFR2 facilita la supervivencia y proliferación en algunas líneas de cáncer de mama (Weigand et al. 2005). Adicionalmente, AIB1

podría promover la secreción de factores que activen la expresión de VEGFR2 en el endotelio mediante un mecanismo paracrino. Además, AIB1 incrementó los niveles de expresión de VEGFR1, el cual a pesar de tener un papel menor en el proceso de neovascularización y de presentar mucha menos actividad tirosina quinasa que VEGFR2 (Shibuya 2001), se ha descrito que participa en la supervivencia de las células endoteliales a través de la activación por VEGF de la ruta PI3K/AKT (Cai et al. 2003). También se ha detectado su expresión en células de cáncer de mama promoviendo de forma autocrina la supervivencia mediada por VEGF (Lee et al. 2007).

Con posterioridad a la obtención de nuestros resultados, se han publicado dos trabajos que apoyan nuestras conclusiones. En primer lugar, AIB1 se ha relacionado con el proceso de angiogénesis mediante el estudio de ratones deficientes en este coactivador (SRC-3^{-/-}). Se ha observado que la función de AIB1 en angiogénesis es dosis dependiente, es decir, ratones SRC-3^{+/-} mostraban una deficiente cicatrización de heridas y la falta completa de AIB1 no empeoró la función en angiogénesis pero sí afectó al número de embarazos y de crías por parto. Además, AIB1 participa en la señalización de FGF favoreciendo la migración celular hacia el lugar que requiere regeneración endotelial (Al-Otaiby et al. 2012). Por otro lado, recientemente se ha demostrado que ERK3 fosforila y activa a AIB1 (Long et al. 2012), promoviendo la interacción de AIB1 con CBP y el factor de transcripción SP-1. Este complejo transcripcional facilita la transcripción de VEGFR2 (Wang et al. 2014a).

Diferentes estudios con líneas celulares y modelos animales han demostrado que AIB1 interacciona con la ruta de señalización de IGF-I/PI3K/AKT a diferentes niveles moleculares (Yan, Tsai, Tsai 2006). Por otra parte, la señalización mediada por IGF-I a través de su receptor IGF-IR juega un papel muy importante en el desarrollo de la glándula mamaria (Rowzee et al. 2008) y en los procesos patológicos que ocurren en este tejido (Sarfstein et al. 2006; Surmacz 2000). Debido a esto, existen múltiples indicios que apuntan a que AIB1 promueve hiperplasia mamaria a través de la ruta de señalización de IGF-I. Para determinar el papel de IGF-I en el crecimiento preneoplásico inducido por la sobreexpresión

de AIB1 en la GM, generamos un modelo murino con delección de *Igf1r* específicamente en el epitelio mamario, ya que el *knockout* completo de IGF-IR es letal (Liu et al. 1993). El genotipado de los ratones *MMTV-Cre^{+/+}/Igf1r^{loxP/loxP}* reveló una parte de *Igf1r* sin deleccionar (alelos *Igf1r^{loxP}*) debido a que la expresión de *Cre* bajo el control del promotor MMTV es exclusiva de célula epitelial pero no se expresa en todos los tipos celulares existentes en la cola de ratón (Wagner et al. 1997). Además, también se ha descrito su expresión heterogénea o en mosaico dentro del mismo tejido epitelial (Wagner et al. 2001). La coexistencia de *Cre* y AIB1 en un mismo ratón no interfirió en la actividad recombinada de *Cre*. Las crías procedentes de los distintos cruces no mostraron diferencias de crecimiento, sugiriendo que la lactancia no estaba impedida en las hembras IGF-IR^{GMKO}.

El análisis comparativo del fenotipo de la GM en los diferentes genotipos mediante tinciones de mama completa, evidenció algunos casos dispares en la morfología y desarrollo ductal dentro de un mismo genotipo. Estos resultados podían indicar que la manifestación fenotípica de la delección de IGF-IR no tenía una penetrancia del 100% y no estaría afectando del mismo modo al desarrollo mamario de todos los ratones. Alternativamente, también era posible que la delección de IGF-IR no estuviera ocurriendo en todas las células del epitelio mamario, ya que se ha descrito la expresión de *Cre* en mosaico en la glándula mamaria (Wagner et al. 2001). Con objeto de averiguar el motivo de la variabilidad fenotípica, analizamos el DNA extraído de la GM de todos los ratones usados para las tinciones de mama completa y realizamos una reacción de PCR que permitía detectar alelos *Igf1r^{loxP}*, *Igf1r⁺* e *Igf1r^{ΔExón 3}*. Este tipo de PCR no se preparaba de forma rutinaria para el genotipado de los ratones mediante biopsia de cola, pero sí se realizó inicialmente con las primeras camadas de los cruces para comprobar que el sistema *Cre-loxP* funcionaba en nuestro modelo animal. Una vez completado el análisis de los DNAs se observó que algunos animales que eran portadores de secuencias loxP pero no eran transgénicos de *Cre*, presentaban el alelo deleccionado *Igf1r^{ΔExón 3}*. Estos resultados sólo podían explicarse si el alelo deleccionado era algo heredado en el ratón, y no un proceso de recombinación postnatal. Tras una reconstrucción meticulosa de la forma en que habíamos

generado los cruces, observamos una correlación clara entre el tipo de cruce del que provenían los ratones y la presencia o no del alelo deletado $Igf1r^{\Delta Exon\ 3}$. Todos los ratones que mostraban el alelo $Igf1r^{\Delta Exon\ 3}$ en ausencia de *Cre* descendían de cruces en los que se había usado en la F1 y/o en la F2 una hembra portadora de $Igf1r^{loxP}$ y del transgén *Cre* a la vez. Si en cada pareja puesta en cruce, el animal portador de *Cre* había sido un macho tanto en la F1 como en la F2, no se producía la aparición de deletaciones de $Igf1r$ en ausencia de *Cre*. En contra de lo esperado en nuestro modelo animal, todos los descendientes de hembras $MMTV-Cre^{+/-}$ y portadoras de algún alelo $Igf1r^{loxP}$, nacerían con un alelo $Igf1r^{\Delta Exon\ 3}$, independientemente de que hubieran o no heredado *Cre*. Estos resultados sugerían que la expresión de *Cre* había tenido lugar en los oocitos de las hembras. Esto podía explicar las diferencias morfológicas observadas en la tinción de mama completa. Está descrito que la línea D de ratones *MMTV-Cre* (la empleada en este trabajo) no expresa *Cre* en oocitos, al contrario que la línea A, que expresa *Cre* en la línea germinal femenina incluso antes de la meiosis (Wagner et al. 2001). Una posibilidad es que el cruce entre distintas cepas para generar los ratones en la F1 y F2 hubiera activado dicha expresión.

En un estudio con ratones que expresan *Cre* bajo el promotor de la queratina 5 (K5) se ha visto que el patrón de recombinación mediado por *Cre* es distinto dependiendo del parental que transmita el transgén. Si la hembra es la portadora de *Cre*, la recombinación de los sitios loxP se produce en los oocitos, transmitiéndose a toda la descendencia (Ramírez et al. 2004). En nuestro caso, se obtuvieron ratones con una deletación congénita en $Igf1r$ (presente en todo el organismo) y no producida de forma postnatal por la recombinación de los sitios loxP mediada por *Cre*. De este modo, en lo que se refiere a la GM de los ratones $IGF-IR^{GMKO}$, estábamos comparando mamas con déficit de IGF-IR estromal (heredado) y epitelial (heredado y postnatal) frente a mamas con déficit de IGF-IR solo a nivel epitelial. Mediante la reacción de PCR utilizada previamente era imposible diferenciar entre el alelo $Igf1r^{\Delta Exon\ 3}$ heredado del generado en el propio animal de estudio. Por este motivo decidimos comenzar de nuevo el estudio seleccionando a machos portadores *Cre* como progenitores.

Las tinciones de mama completa de hembras vírgenes de 7 semanas de edad revelaron que el epitelio de las hembras tgAIB1 presentaba mayor elongación ductal y mayor número de ramificaciones que el de las GM silvestres, tal y como se había observado previamente en nuestro modelo animal (Avivar et al. 2006). La glándula mamaria deficiente en IGF-IR mostró un crecimiento reducido, con menor elongación y ramificación ductal. Estos hallazgos coinciden con los observados en distintos trabajos en los que se deleccionaba en la GM IGF-I o IGF-IR (Bonnette and Hadsell 2001; Loladze et al. 2006; Richards et al. 2004). La GM IGF-IR^{GMKO}/tgAIB1, a diferencia de la GM IGF-IR^{GMKO}, había recuperado el crecimiento ductal asemejándose más a la morfología de la GM tgAIB1. Este resultado apoya a que AIB1 promueve la hiperplasia mamaria independientemente de IGF-IR. Una posibilidad es que la sobreexpresión de IGF-I debida a AIB1 active al receptor de insulina (IR) para promover la proliferación de la célula epitelial de un modo autocrino. Sin embargo, es poco probable que este mecanismo explique el fenotipo de la GM tgAIB1, ya que en condiciones fisiológicas la afinidad de IGF-I por IR es 1/100 de la afinidad de IGF-I por IGF-IR (Annunziata, Granata, Ghigo 2011). Alternativamente, la sobreexpresión de AIB1 puede estar activando otras rutas como la de VEGFR2 o la de HER2 para aumentar la proliferación epitelial. En sentido, nuestros resultados revelan que los ratones transgénicos de AIB1 tienen mayor actividad del promotor de VEGFR2 y mayor expresión a nivel de mRNA de VEGFR1 y VEGFR2. Ambos receptores se han relacionado con la proliferación y supervivencia de células de cáncer de mama (Lee et al. 2007; Weigand et al. 2005). Por otro lado, existe una interacción entre las rutas de la familia EGFR y la de IGF-IR (Jin and Esteva 2008). Adicionalmente, el heterodímero formado por los receptores HER2/HER3 juega un papel crítico en la activación de la ruta PI3K/AKT en neoplasia mamaria humana (Holbro et al. 2003) y murina (Fereshteh et al. 2008; Siegel et al. 1999).

A las 11 semanas de edad no se observaron diferencias en la elongación ductal, ya que los ductos en los 4 genotipos habían alcanzado prácticamente el extremo dorsal del estroma. En la GM IGF-IR^{GMKO} esto es debido probablemente a la acción proliferativa de los sucesivos ciclos estrales. Esto ha sido observado

también en ratones con una delección específica en la GM de FGFR2 (Lu et al. 2008). Sin embargo, sí que se observaron diferencias en el rellenado del estroma. La mama tgAIB1 presentaba mayor densidad de ductos. La GM IGF-IR^{GMKO} tenía un estroma más despoblado y al igual que ocurría a las 7 semanas, la GM IGF-IR^{GMKO}/tgAIB1 presentaba un desarrollo mayor, parecido al de la GM tgAIB1.

La medida de la penetración ductal relativa reveló que, aunque a las 7 semanas la GM IGF-IR^{GMKO}/tgAIB1 no había crecido tanto como la WT, a las 11 semanas se había recuperado la penetración ductal superando el valor obtenido en la mama WT. Estos resultados sugieren que la influencia de AIB1 en la elongación ductal continúa más allá del inicio de la pubertad.

La cuantificación del porcentaje de ocupación epitelio/estroma y del número de ramificaciones revelaron que la sobreexpresión de AIB1 promueve el incremento del desarrollo ductal en todas sus dimensiones, siendo este aumento independiente de IGF-IR (Senoret et al. 2012).

En secciones de tejido, las mamas de ratones WT mostraban una tinción débil para IGF-IR, por lo que en ratones IGF-IR^{GMKO} la distinción entre células positivas y células deficientes en IGF-IR era dificultosa. Una posible explicación para esta señal débil sería que normalmente las inmunodetecciones de IGF-IR suelen hacerse en tejidos que sobreexpresan el receptor, como tumores o mamas derivadas de ratones transgénicos para IGF-IR (Jones et al. 2007). A pesar de no haber conseguido un doble marcaje Cre/IGF-IR, el patrón de señales obtenido con el anticuerpo anti-IGF-IR demostraba que existía mosaicismo en la delección de IGF-IR, como se había descrito anteriormente (Lu et al. 2008; Wagner et al. 2001). La detección y cuantificación del marcador de proliferación PCNA en las secciones de tejido, confirmó que la sobreexpresión de AIB1 en la GM de ratones IGF-IR^{GMKO} producía un rescate de la proliferación independiente de IGF-IR.

Obtuvimos cultivos primarios de células epiteliales mamarias (MMECs). Comprobamos que los cultivos expresaban los transgenes descritos en el modelo animal mediante el análisis del RNA. Esto es particularmente interesante en el transgén Cre, ya que se ha descrito que no siempre coincide lo observado a nivel de genotipado con la expresión posterior de la recombinasa. Es decir, puede ser

que la PCR con DNA genómico resulte positiva para Cre, pero luego no se detecte expresión de mRNA o de proteína (Schulz et al. 2007). Esto hace necesario la cantidad de comprobaciones que hemos realizado en este trabajo: a nivel genómico, a nivel de mRNA y a nivel proteico respecto a Cre, y también respecto al gen diana que queremos eliminar, en nuestro caso IGF-IR. Por ello, para controlar meticulosamente la delección de IGF-IR hemos empleado diversas aproximaciones: una pareja de cebadores diseñados para DNA genómico (los utilizados en la PCR anteriormente descrita) (Kloting et al. 2008), otra pareja de cebadores que detectan la delección del exón 3 en el mRNA de *Igf1r*, mostrando una banda de menor tamaño que la del *Igf1r* íntegro (los que hemos utilizado en los cultivos MMECs) y la detección de la proteína IGF-IR en tejido y en MMECs. El análisis del ciclo celular de estos cultivos confirmó lo que habíamos observado a nivel morfológico: las mamas deficientes en IGF-IR presentan mayor porcentaje de células en fase G0/G1 y menor fase G2/M. En cambio la sobreexpresión de AIB1 revierte este fenómeno, alcanzando el cultivo IGF-IR^{GMKO}/tgAIB1 niveles proliferativos similares a los del cultivo WT.

En un cultivo primario de células epiteliales de mama humanas (HMEC), el silenciamiento de IGF-IR provocó una detención del ciclo celular en la fase G2. Esto es compatible con un estudio previo que describió a IGF-I como mediador crítico en la progresión de G2 (Adesanya et al. 1999). La sobreexpresión de AIB1 en estos cultivos reactivó la entrada en el ciclo celular y la proliferación, como se demostró por los niveles elevados de PCNA y p-AKT y por el mayor índice proliferativo de las células IGF-IR^{GMKO}/tgAIB1 obtenido en un ensayo MTT.

Estos resultados confirman en una línea celular humana lo observado en los ratones: la proliferación e hiperplasia mamaria inducida por la sobreexpresión de AIB1 no requiere necesariamente la señalización a través de IGF-IR, pueden existir otras rutas que participen en los efectos de AIB1 en la glándula mamaria.

Como coactivador transcripcional, AIB1 puede promover la expresión de ciclina D1 activando la transcripción mediada por el receptor de estrógenos y E2F1 (Louie et al. 2004; Planas-Silva et al. 2001), así como la expresión de genes importantes para la iniciación de la replicación del DNA (Louie et al. 2006). Estas

dianas moleculares de AIB1 pueden explicar su papel en la proliferación celular independientemente de IGF-I. Por otro lado, la prevención de apoptosis podría ser otro mecanismo por el cual se favorece la hiperplasia mamaria observada en los ratones tgAIB1. Numerosos estudios han demostrado que AIB1 cumple un papel crucial no solo en el crecimiento y la proliferación celular sino también como modulador negativo de la apoptosis. De hecho, la eliminación de AIB1 provoca un aumento significativo de la apoptosis (Colo et al. 2007; Torres-Arzayus et al. 2004). Recientemente, en nuestro grupo se ha descrito que AIB1 suprime la expresión del factor proapoptótico DRO1 (Ferragud et al. 2011), un gen supresor de tumores también reprimido por otros oncogenes (Bommer et al. 2005). De este modo, DRO1 y la señalización de IGF-IR podrán representar dos rutas inducidas por AIB1 importantes en la inhibición de apoptosis, pero independientes de la proliferación inducida por AIB1. Por otro lado, se sabe que en el remodelado que ocurre en la GM durante el ciclo estral y durante las fases de ramificación ductal e involución, se dan fenómenos de proliferación y de apoptosis. La remodelación es orquestada por cambios en la expresión de metaloproteasas como MMP9 y MMP13 y de inhibidores de metaloproteasas como TIMP3 y TIMP4 (Fata, Chaudhary, Khokha 2001). Las metaloproteasas (MMPs) muestran un papel muy importante en el remodelado de la GM, ya que son capaces de degradar la matriz extracelular, la cual es un componente estructural principal en el estroma mamario. Las bifurcaciones de las yemas terminales (TEBs) y la ramificación lateral son dos procesos en los que participan las metaloproteasas. La biodisponibilidad de VEGF también está mediada por la actividad de las metaloproteasas (Bergers et al. 2000). La remodelación del tejido mamario es la suma de un balance entre señales de supervivencia/muerte o de señales pro/antiinflamatorias. Las metaloproteasas tienen la capacidad de orquestar estas interacciones entre epitelio y estroma y son la base del programa de remodelado mamario. Esto puede ser interesante ya que se ha visto que AIB1 regula la transcripción de varias MMPs y quizá este podría ser un mecanismo por el que AIB1 promueve hiperplasia (Goel and Janknecht 2004; Li et al. 2008; Long et al. 2012; Qin et al. 2008; Yan et al. 2008). Otro mecanismo regulador para AIB1 es su redistribución

subcelular. En nuestro grupo se ha encontrado que el transporte nuclear de AIB1 se ha correlacionado con la progresión del ciclo celular en células no cancerosas (Avivar et al. 2006), pero la distribución se ha visto que está alterada en células de cáncer de mama (Ferrero et al. 2008). Este tráfico subcelular es dependiente de IKK e importina $\alpha 3$ (Park et al. 2005; Wu et al. 2002), de este modo constituyendo otro potencial mecanismo para la regulación de AIB1 independiente de IGF-I.

Estudios en profundidad son necesarios para identificar las rutas que son requeridas para la hiperplasia inducida por AIB1 y la posterior progresión al crecimiento canceroso, lo que debería ayudar a predecir el pronóstico de los tumores de mama y podría constituir potenciales dianas terapéuticas para mejorar el diagnóstico y la terapia en cáncer de mama.

CONCLUSIONES

1. La delección de IGF-IR se produjo de manera significativa en el epitelio mamario como para ver un efecto fenotípico claro, pese a que los ratones transgénicos *MMTV-Cre* presentaron un patrón de expresión en mosaico.
2. La sobreexpresión moderada de AIB1 en la glándula mamaria de hembras vírgenes de 7 y 11 semanas de edad, produjo un mayor crecimiento ductal y ramificación lateral. La eliminación de IGF-IR en el epitelio mamario resultó en menor elongación ductal y menor número de ramificaciones, fenotipo que fue rescatado por la sobreexpresión de AIB1. Este resultado apoya el que la hiperplasia mamaria promovida por AIB1 no depende exclusivamente de la señalización de IGF-I.
3. La sobreexpresión de AIB1 en cultivos primarios de células epiteliales de glándulas mamarias murinas produjo un aumento de la proliferación celular, incluso en células deficientes en IGF-IR, apoyando el efecto proliferativo de AIB1 de modo independiente de IGF-I.
4. El silenciamiento de la expresión de IGF-IR en cultivo primario de células epiteliales de mama humana resultó en la acumulación de células en la fase G2 del ciclo celular. La sobreexpresión de AIB1 en estos cultivos reactivó su entrada en el ciclo celular aumentando la proliferación celular.
5. La sobreexpresión de AIB1 en cultivo primario de células epiteliales de mama humana previamente silenciadas en la expresión de IGF-IR provocó el aumento de la fosforilación de AKT y la expresión de PCNA, indicadores de mayor supervivencia y proliferación celular.
6. La sobreexpresión moderada de AIB1 en la glándula mamaria activó el promotor de VEGFR2 en hembras vírgenes de 4 y 7 semanas de edad, apoyando la mayor proliferación observada en el epitelio y sugiriendo una posible activación paracrina de angiogénesis en el endotelio colindante.
7. La sobreexpresión de AIB1 activó al promotor de VEGFR2 en un ensayo *in vitro* con lisados proteicos de glándulas mamarias de ratones vírgenes de 4 y 7 semanas de edad, corroborando el estudio *in vivo*.

8. La sobreexpresión de AIB1 en la glándula mamaria aumentó los niveles de expresión de dos de los genes más importantes implicados en proliferación y angiogénesis, VEGFR1 y VEGFR2, tanto a las 4 como a las 7 semanas de edad.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams JM and Cory S. 2007. The bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 26(9):1324-37.
- Adams JM, Harris AW, Pinkert CA, Corcoran LM, Alexander WS, Cory S, Palmiter RD, Brinster RL. 1985. The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature* 318(6046):533-8.
- Adams TE, Epa VC, Garrett TP, Ward CW. 2000. Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Cell Mol Life Sci* 57(7):1050-93.
- Adesanya OO, Zhou J, Samathanam C, Powell-Braxton L, Bondy CA. 1999. Insulin-like growth factor 1 is required for G2 progression in the estradiol-induced mitotic cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(6):3287-91.
- Ahmad Kiadaliri A, Jarl J, Gavriilidis G, Gerdtham UG. 2013. Alcohol drinking cessation and the risk of laryngeal and pharyngeal cancers: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 8(3):e58158.
- Al-Otaiby M, Tassi E, Schmidt MO, Chien CD, Baker T, Salas AG, Xu J, Furlong M, Schlegel R, Riegel AT, et al. 2012. Role of the nuclear receptor coactivator AIB1/SRC-3 in angiogenesis and wound healing. *Am J Pathol* 180(4):1474-84.
- Amit I, Citri A, Shay T, Lu Y, Katz M, Zhang F, Tarcic G, Siwak D, Lahad J, Jacob-Hirsch J, et al. 2007. A module of negative feedback regulators defines growth factor signaling. *Nat Genet* 39(4):503-12.
- Ananthaswamy HN. 2001. Sunlight and skin cancer. *J Biomed Biotechnol* 1(2):49.
- Annunziata M, Granata R, Ghigo E. 2011. The IGF system. *Acta Diabetol* 48(1):1-9.
- Anzick SL, Kononen J, Walker RL, Azorsa DO, Tanner MM, Guan XY, Sauter G, Kallioniemi OP, Trent JM, Meltzer PS. 1997. AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* 277(5328):965-8.
- Apostolakis EM, Ramamurphy M, Zhou D, Onate S, O'Malley BW. 2002. Acute disruption of select steroid receptor coactivators prevents reproductive behavior in rats and unmasks genetic adaptation in knockout mice. *Mol Endocrinol* 16(7):1511-23.

- Avivar A, Garcia-Macias MC, Ascaso E, Herrera G, O'Connor JE, Font de Mora J. 2006. Moderate overexpression of AIB1 triggers pre-neoplastic changes in mammary epithelium. *FEBS Lett* 580(22):5222-6.
- Ayala G, Yan J, Li R, Ding Y, Thompson TC, Mims MP, Hayes TG, MacDonnell V, Lynch RG, Frolov A, et al. 2008. Bortezomib-mediated inhibition of steroid receptor coactivator-3 degradation leads to activated akt. *Clin Cancer Res* 14(22):7511-8.
- Azorsa DO, Cunliffe HE, Meltzer PS. 2001. Association of steroid receptor coactivator AIB1 with estrogen receptor-alpha in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 70(2):89-101.
- Baggstrom MQ, Qi Y, Koczywas M, Argiris A, Johnson EA, Millward MJ, Murphy SC, Erlichman C, Rudin CM, Govindan R, et al. 2011. A phase II study of AT-101 (gossypol) in chemotherapy-sensitive recurrent extensive-stage small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 6(10):1757-60.
- Bai J, Uehara Y, Montell DJ. 2000. Regulation of invasive cell behavior by taiman, a drosophila protein related to AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast cancer. *Cell* 103(7):1047-58.
- Bao Q, Pan J, Qi H, Wang L, Qian H, Jiang F, Shao Z, Xu F, Tao Z, Ma Q, et al. 2014. Aging and age-related diseases--from endocrine therapy to target therapy. *Mol Cell Endocrinol* 394(1-2):115-8.
- Baserga R. 2000. The contradictions of the insulin-like growth factor 1 receptor. *Oncogene* 19(49):5574-81.
- Bates P, Fisher R, Ward A, Richardson L, Hill DJ, Graham CF. 1995. Mammary cancer in transgenic mice expressing insulin-like growth factor II (IGF-II). *Br J Cancer* 72(5):1189-93.
- Bautista S, Valles H, Walker RL, Anzick S, Zeillinger R, Meltzer P, Theillet C. 1998. In breast cancer, amplification of the steroid receptor coactivator gene AIB1 is correlated with estrogen and progesterone receptor positivity. *Clin Cancer Res* 4(12):2925-9.
- Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z, et al. 2000. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2(10):737-44.
- Blasco MA. 2005. Telomeres and human disease: Ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet* 6(8):611-22.

- Bommer GT, Jager C, Durr EM, Baehs S, Eichhorst ST, Brabletz T, Hu G, Frohlich T, Arnold G, Kress DC, et al. 2005. DRO1, a gene down-regulated by oncogenes, mediates growth inhibition in colon and pancreatic cancer cells. *J Biol Chem* 280(9):7962-75.
- Bonnette SG and Hadsell DL. 2001. Targeted disruption of the IGF-I receptor gene decreases cellular proliferation in mammary terminal end buds. *Endocrinology* 142(11):4937-45.
- Bouras T, Southey MC, Venter DJ. 2001. Overexpression of the steroid receptor coactivator AIB1 in breast cancer correlates with the absence of estrogen and progesterone receptors and positivity for p53 and HER2/neu. *Cancer Res* 61(3):903-7.
- Boyd NF, Martin LJ, Rommens JM, Paterson AD, Minkin S, Yaffe MJ, Stone J, Hopper JL. 2009. Mammographic density: A heritable risk factor for breast cancer. *Methods Mol Biol* 472:343-60.
- Brown CJ, Lain S, Verma CS, Fersht AR, Lane DP. 2009. Awakening guardian angels: Drugging the p53 pathway. *Nat Rev Cancer* 9(12):862-73.
- Burandt E, Jens G, Holst F, Janicke F, Muller V, Quaas A, Choschzick M, Wilczak W, Terracciano L, Simon R, et al. 2013. Prognostic relevance of AIB1 (NCoA3) amplification and overexpression in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 137(3):745-53.
- Cadoret A, Desbois-Mouthon C, Wendum D, Leneuve P, Perret C, Tronche F, Housset C, Holzenberger M. 2005. c-myc-induced hepatocarcinogenesis in the absence of IGF-I receptor. *Int J Cancer* 114(4):668-72.
- Cai D, Shames DS, Raso MG, Xie Y, Kim YH, Pollack JR, Girard L, Sullivan JP, Gao B, Peyton M, et al. 2010. Steroid receptor coactivator-3 expression in lung cancer and its role in the regulation of cancer cell survival and proliferation. *Cancer Res* 70(16):6477-85.
- Cai J, Ahmad S, Jiang WG, Huang J, Kontos CD, Boulton M, Ahmed A. 2003. Activation of vascular endothelial growth factor receptor-1 sustains angiogenesis and bcl-2 expression via the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in endothelial cells. *Diabetes* 52(12):2959-68.
- Carapeti M, Aguiar RC, Chase A, Goldman JM, Cross NC. 1998. Assignment of the steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) gene to human chromosome band 2p23. *Genomics* 52(2):242-4.

- Cardona-Gomez GP, Chowen JA, Garcia-Segura LM. 2000. Estradiol and progesterone regulate the expression of insulin-like growth factor-I receptor and insulin-like growth factor binding protein-2 in the hypothalamus of adult female rats. *J Neurobiol* 43(3):269-81.
- Carmeliet P. 2005. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* 69 Suppl 3:4-10.
- Carreon T, Hein MJ, Viet SM, Hanley KW, Ruder AM, Ward EM. 2010. Increased bladder cancer risk among workers exposed to o-toluidine and aniline: A reanalysis. *Occup Environ Med* 67(5):348-50.
- Carretero J, Blanco EJ, Carretero M, Carretero-Hernandez M, Garcia-Barrado MJ, Iglesias-Osma MC, Burks DJ, Font de Mora J. 2013. The expression of AIB1 correlates with cellular proliferation in human prolactinomas. *Ann Anat* 195(3):253-9.
- Carroll RS, Brown M, Zhang J, DiRenzo J, Font De Mora J, Black PM. 2000. Expression of a subset of steroid receptor cofactors is associated with progesterone receptor expression in meningiomas. *Clin Cancer Res* 6(9):3570-5.
- Chang AK and Wu H. 2012. The role of AIB1 in breast cancer. *Oncol Lett* 4(4):588-94.
- Chen H, Lin RJ, Schiltz RL, Chakravarti D, Nash A, Nagy L, Privalsky ML, Nakatani Y, Evans RM. 1997. Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell* 90(3):569-80.
- Chen X, Liu Z, Xu J. 2010. The cooperative function of nuclear receptor coactivator 1 (NCOA1) and NCOA3 in placental development and embryo survival. *Mol Endocrinol* 24(10):1917-34.
- Chen X, Qin L, Liu Z, Liao L, Martin JF, Xu J. 2015. Knockout of SRC-1 and SRC-3 in mice decreases cardiomyocyte proliferation and causes a noncompaction cardiomyopathy phenotype. *Int J Biol Sci* 11(9):1056-72.
- Cheon DJ and Orsulic S. 2011. Mouse models of cancer. *Annu Rev Pathol* 6:95-119.
- Chitnis MM, Yuen JS, Protheroe AS, Pollak M, Macaulay VM. 2008. The type 1 insulin-like growth factor receptor pathway. *Clin Cancer Res* 14(20):6364-70.

- Chung AC, Zhou S, Liao L, Tien JC, Greenberg NM, Xu J. 2007. Genetic ablation of the amplified-in-breast cancer 1 inhibits spontaneous prostate cancer progression in mice. *Cancer Res* 67(12):5965-75.
- Colditz GA, Rosner BA, Speizer FE. 1996. Risk factors for breast cancer according to family history of breast cancer. for the nurses' health study research group. *J Natl Cancer Inst* 88(6):365-71.
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. 2012. Menarche, menopause, and breast cancer risk: Individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *Lancet Oncol* 13(11):1141-51.
- Colo GP, Rosato RR, Grant S, Costas MA. 2007. RAC3 down-regulation sensitizes human chronic myeloid leukemia cells to TRAIL-induced apoptosis. *FEBS Lett* 581(26):5075-81.
- Coppola D, Ferber A, Miura M, Sell C, D'Ambrosio C, Rubin R, Baserga R. 1994. A functional insulin-like growth factor I receptor is required for the mitogenic and transforming activities of the epidermal growth factor receptor. *Mol Cell Biol* 14(7):4588-95.
- Corkery D, Thillainadesan G, Coughlan N, Mohan RD, Isovici M, Tini M, Torchia J. 2011. Regulation of the BRCA1 gene by an SRC3/53BP1 complex. *BMC Biochem* 12:50,2091-12-50.
- Cory S, Huang DC, Adams JM. 2003. The bcl-2 family: Roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 22(53):8590-607.
- Coste A, Antal MC, Chan S, Kastner P, Mark M, O'Malley BW, Auwerx J. 2006. Absence of the steroid receptor coactivator-3 induces B-cell lymphoma. *Embo j* 25(11):2453-64.
- Coste A, Louet JF, Lagouge M, Lerin C, Antal MC, Meziane H, Schoonjans K, Puigserver P, O'Malley BW, Auwerx J. 2008. The genetic ablation of SRC-3 protects against obesity and improves insulin sensitivity by reducing the acetylation of PGC-1{alpha}. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(44):17187-92.
- Dalal RS and Moss SF. 2014. At the bedside: Helicobacter pylori, dysregulated host responses, DNA damage, and gastric cancer. *J Leukoc Biol* 96(2):213-24.
- Daniel CW and Smith GH. 1999. The mammary gland: A model for development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 4(1):3-8.

- Davies MA and Samuels Y. 2010. Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. *Oncogene* 29(41):5545-55.
- del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R, Nunez G. 1997. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase akt. *Science* 278(5338):687-9.
- DePasquale JA. 1999. Rearrangement of the F-actin cytoskeleton in estradiol-treated MCF-7 breast carcinoma cells. *Histochem Cell Biol* 112(5):341-50.
- Desbois-Mouthon C, Wendum D, Cadoret A, Rey C, Leneuve P, Blaise A, Housset C, Tronche F, Le Bouc Y, Holzenberger M. 2006. Hepatocyte proliferation during liver regeneration is impaired in mice with liver-specific IGF-1R knockout. *Faseb j* 20(6):773-5.
- Donate LE and Blasco MA. 2011. Telomeres in cancer and ageing. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366(1561):76-84.
- Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA, Jr, Butel JS, Bradley A. 1992. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356(6366):215-21.
- Edvardsson K, Nguyen-Vu T, Kalasekar SM, Ponten F, Gustafsson JA, Williams C. 2013. Estrogen receptor beta expression induces changes in the microRNA pool in human colon cancer cells. *Carcinogenesis* 34(7):1431-41.
- Eedunuri VK, Rajapakshe K, Fiskus W, Geng C, Chew SA, Foley C, Shah SS, Shou J, Mohamed JS, Coarfa C, et al. 2015. miR-137 targets p160 steroid receptor coactivators SRC1, SRC2, and SRC3 and inhibits cell proliferation. *Mol Endocrinol* 29(8):1170-83.
- Ernani V and Saba NF. 2015. Oral cavity cancer: Risk factors, pathology, and management. *Oncology* 89(4):187-95.
- Fang ZH and Han ZC. 2006. The transcription factor E2F: A crucial switch in the control of homeostasis and tumorigenesis. *Histol Histopathol* 21(4):403-13.
- Fata JE, Chaudhary V, Khokha R. 2001. Cellular turnover in the mammary gland is correlated with systemic levels of progesterone and not 17beta-estradiol during the estrous cycle. *Biol Reprod* 65(3):680-8.
- Fereshteh MP, Tilli MT, Kim SE, Xu J, O'Malley BW, Wellstein A, Furth PA, Riegel AT. 2008. The nuclear receptor coactivator amplified in breast cancer-1 is

- required for neu (ErbB2/HER2) activation, signaling, and mammary tumorigenesis in mice. *Cancer Res* 68(10):3697-706.
- Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, Forman D, Bray F. 2013. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 49(6):1374-403.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136(5):E359-86.
- Ferragud J, Avivar-Valderas A, Pla A, De Las Rivas J, Font de Mora J. 2011. Transcriptional repression of the tumor suppressor DRO1 by AIB1. *FEBS Lett* 585(19):3041-6.
- Ferrara N. 2010. Pathways mediating VEGF-independent tumor angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 21(1):21-6.
- Ferrara N. 2009. VEGF-A: A critical regulator of blood vessel growth. *Eur Cytokine Netw* 20(4):158-63.
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. 2003. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9(6):669-76.
- Ferrero M and Font de Mora J. 2012. AIB1: A transcriptional coactivator which integrates signalling cross talk in cancer cells. In: *Cell signalling & molecular targets in cancer*. Chatterjee M and Kashfi K, editors. Springer science. 129-166 p.
- Ferrero M, Avivar A, Garcia-Macias MC, Font de Mora J. 2008. Phosphoinositide 3-kinase/AKT signaling can promote AIB1 stability independently of GSK3 phosphorylation. *Cancer Res* 68(13):5450-9.
- Finak G, Bertos N, Pepin F, Sadekova S, Souleimanova M, Zhao H, Chen H, Omeroglu G, Meterissian S, Omeroglu A, et al. 2008. Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nat Med* 14(5):518-27.
- Fisher GH, Wellen SL, Klimstra D, Lenczowski JM, Tichelaar JW, Lizak MJ, Whitsett JA, Koretsky A, Varmus HE. 2001. Induction and apoptotic regression of lung adenocarcinomas by regulation of a K-ras transgene in the presence and absence of tumor suppressor genes. *Genes Dev* 15(24):3249-62.

- Flavell KJ and Murray PG. 2000. Hodgkin's disease and the epstein-barr virus. *Mol Pathol* 53(5):262-9.
- Fodde R. 2002. The APC gene in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 38(7):867-71.
- Font de Mora J and Brown M. 2000. AIB1 is a conduit for kinase-mediated growth factor signaling to the estrogen receptor. *Mol Cell Biol* 20(14):5041-7.
- Franke TF. 2008. PI3K/Akt: Getting it right matters. *Oncogene* 27(50):6473-88.
- Gandini S, Botteri E, Iodice S, Boniol M, Lowenfels AB, Maisonneuve P, Boyle P. 2008. Tobacco smoking and cancer: A meta-analysis. *Int J Cancer* 122(1):155-64.
- Garee JP, Chien CD, Li JV, Wellstein A, Riegel AT. 2014. Regulation of HER2 oncogene transcription by a multifunctional coactivator/corepressor complex. *Mol Endocrinol* 28(6):846-59.
- Gingrich JR and Greenberg NM. 1996. A transgenic mouse prostate cancer model. *Toxicol Pathol* 24(4):502-4.
- Giraud S, Bienvenu F, Avril S, Gascan H, Heery DM, Coqueret O. 2002. Functional interaction of STAT3 transcription factor with the coactivator NcoA/SRC1a. *J Biol Chem* 277(10):8004-11.
- Girnita L, Worrall C, Takahashi S, Seregard S, Girnita A. 2014. Something old, something new and something borrowed: Emerging paradigm of insulin-like growth factor type 1 receptor (IGF-1R) signaling regulation. *Cell Mol Life Sci* 71(13):2403-27.
- Goel A and Janknecht R. 2004. Concerted activation of ETS protein ER81 by p160 coactivators, the acetyltransferase p300 and the receptor tyrosine kinase HER2/Neu. *J Biol Chem* 279(15):14909-16.
- Goh AM, Coffill CR, Lane DP. 2011. The role of mutant p53 in human cancer. *J Pathol* 223(2):116-26.
- Goldman AS, Chheda S, Garofalo R. 1998. Evolution of immunologic functions of the mammary gland and the postnatal development of immunity. *Pediatr Res* 43(2):155-62.
- Gunther JR, Du Y, Rhoden E, Lewis I, Revennaugh B, Moore TW, Kim SH, Dingledine R, Fu H, Katzenellenbogen JA. 2009. A set of time-resolved

- fluorescence resonance energy transfer assays for the discovery of inhibitors of estrogen receptor-coactivator binding. *J Biomol Screen* 14(2):181-93.
- Guo S, Xu J, Xue R, Liu Y, Yu H. 2014. Overexpression of AIB1 correlates inversely with E-cadherin expression in pancreatic adenocarcinoma and may promote lymph node metastasis. *Int J Clin Oncol* 19(2):319-24.
- Guy CT, Webster MA, Schaller M, Parsons TJ, Cardiff RD, Muller WJ. 1992. Expression of the neu protooncogene in the mammary epithelium of transgenic mice induces metastatic disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(22):10578-82.
- Hadsell DL and Bonnette SG. 2000. IGF and insulin action in the mammary gland: Lessons from transgenic and knockout models. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5(1):19-30.
- Hadsell DL, Torres DT, Lawrence NA, George J, Parlow AF, Lee AV, Fiorotto ML. 2005. Overexpression of des(1-3) insulin-like growth factor 1 in the mammary glands of transgenic mice delays the loss of milk production with prolonged lactation. *Biol Reprod* 73(6):1116-25.
- Hamajima N, Hirose K, Tajima K, Rohan T, Calle EE, Heath CW, Jr, Coates RJ, Liff JM, Talamini R, Chantarakul N, et al. 2002. Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. *Br J Cancer* 87(11):1234-45.
- Han G, Xie S, Fang H, Li G, Han Y, Qin Z. 2014. The AIB1 gene polyglutamine repeat length polymorphism contributes to risk of epithelial ovarian cancer risk: A case-control study. *Tumour Biol* .
- Hanahan D and Weinberg RA. 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144(5):646-74.
- Heneghan HM, Miller N, Kelly R, Newell J, Kerin MJ. 2010. Systemic miRNA-195 differentiates breast cancer from other malignancies and is a potential biomarker for detecting noninvasive and early stage disease. *Oncologist* 15(7):673-82.
- Henke RT, Haddad BR, Kim SE, Rone JD, Mani A, Jessup JM, Wellstein A, Maitra A, Riegel AT. 2004. Overexpression of the nuclear receptor coactivator AIB1 (SRC-3) during progression of pancreatic adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 10(18 Pt 1):6134-42.

- Hennighausen L and Robinson GW. 2005. Information networks in the mammary gland. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(9):715-25.
- Hennighausen L and Robinson GW. 1998. Think globally, act locally: The making of a mouse mammary gland. *Genes Dev* 12(4):449-55.
- Hernandez-Sanchez C, Werner H, Roberts CT, Jr, Woo EJ, Hum DW, Rosenthal SM, LeRoith D. 1997. Differential regulation of insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor gene expression by IGF-I and basic fibroblastic growth factor. *J Biol Chem* 272(8):4663-70.
- Holbro T, Civenni G, Hynes NE. 2003. The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res* 284(1):99-110.
- Holbro T, Beerli RR, Maurer F, Koziczak M, Barbas CF, 3rd, Hynes NE. 2003. The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(15):8933-8.
- Holzenberger M, Leneuve P, Hamard G, Ducos B, Perin L, Binoux M, Le Bouc Y. 2000. A targeted partial invalidation of the insulin-like growth factor I receptor gene in mice causes a postnatal growth deficit. *Endocrinology* 141(7):2557-66.
- Holzenberger M, Dupont J, Ducos B, Leneuve P, Geloën A, Even PC, Cervera P, Le Bouc Y. 2003. IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature* 421(6919):182-7.
- Holzenberger M, Hamard G, Zaoui R, Leneuve P, Ducos B, Beccavin C, Perin L, Le Bouc Y. 2001. Experimental IGF-I receptor deficiency generates a sexually dimorphic pattern of organ-specific growth deficits in mice, affecting fat tissue in particular. *Endocrinology* 142(10):4469-78.
- Hossain A, Kuo MT, Saunders GF. 2006. Mir-17-5p regulates breast cancer cell proliferation by inhibiting translation of AIB1 mRNA. *Mol Cell Biol* 26(21):8191-201.
- Howard BA and Gusterson BA. 2000. Human breast development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5(2):119-37.
- Hu ZZ, Kagan BL, Ariazi EA, Rosenthal DS, Zhang L, Li JV, Huang H, Wu C, Jordan VC, Riegel AT, et al. 2011. Proteomic analysis of pathways involved in estrogen-induced growth and apoptosis of breast cancer cells. *PLoS One* 6(6):e20410.

- Huber MA, Kraut N, Beug H. 2005. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol* 17(5):548-58.
- Hurtado A, Holmes KA, Geistlinger TR, Hutcheson IR, Nicholson RI, Brown M, Jiang J, Howat WJ, Ali S, Carroll JS. 2008. Regulation of ERBB2 by oestrogen receptor-PAX2 determines response to tamoxifen. *Nature* 456(7222):663-6.
- Iannaccone EA, Yan AW, Gauger KJ, Dowling AL, Zoeller RT. 2002. Thyroid hormone exerts site-specific effects on SRC-1 and NCoR expression selectively in the neonatal rat brain. *Mol Cell Endocrinol* 186(1):49-59.
- Iordanidou P, Aggelidou E, Demetriades C, Hadzopoulou-Cladaras M. 2005. Distinct amino acid residues may be involved in coactivator and ligand interactions in hepatocyte nuclear factor-4alpha. *J Biol Chem* 280(23):21810-9.
- Jacks T, Fazeli A, Schmitt EM, Bronson RT, Goodell MA, Weinberg RA. 1992. Effects of an rb mutation in the mouse. *Nature* 359(6393):295-300.
- Jiang BH and Liu LZ. 2009. PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Adv Cancer Res* 102:19-65.
- Jiang HL, Yu H, Ma X, Xu D, Lin GF, Ma DY, Jin JZ. 2014. MicroRNA-195 regulates steroid receptor coactivator-3 protein expression in hepatocellular carcinoma cells. *Tumour Biol* 35(7):6955-60.
- Jin Q and Esteva FJ. 2008. Cross-talk between the ErbB/HER family and the type I insulin-like growth factor receptor signaling pathway in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 13(4):485-98.
- Jones RA and Moorehead RA. 2008. The impact of transgenic IGF-IR overexpression on mammary development and tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 13(4):407-13.
- Jones RA, Campbell CI, Petrik JJ, Moorehead RA. 2008. Characterization of a novel primary mammary tumor cell line reveals that cyclin D1 is regulated by the type I insulin-like growth factor receptor. *Mol Cancer Res* 6(5):819-28.
- Jones RA, Campbell CI, Gunther EJ, Chodosh LA, Petrik JJ, Khokha R, Moorehead RA. 2007. Transgenic overexpression of IGF-IR disrupts mammary ductal morphogenesis and induces tumor formation. *Oncogene* 26(11):1636-44.

- Jones RG and Thompson CB. 2009. Tumor suppressors and cell metabolism: A recipe for cancer growth. *Genes Dev* 23(5):537-48.
- Kajiro M, Hirota R, Nakajima Y, Kawanowa K, So-ma K, Ito I, Yamaguchi Y, Ohie SH, Kobayashi Y, Seino Y, et al. 2009. The ubiquitin ligase CHIP acts as an upstream regulator of oncogenic pathways. *Nat Cell Biol* 11(3):312-9.
- Kalkhoven E, Valentine JE, Heery DM, Parker MG. 1998. Isoforms of steroid receptor co-activator 1 differ in their ability to potentiate transcription by the oestrogen receptor. *Embo j* 17(1):232-43.
- Kampert JB, Whittemore AS, Paffenbarger RS,Jr. 1988. Combined effect of childbearing, menstrual events, and body size on age-specific breast cancer risk. *Am J Epidemiol* 128(5):962-79.
- Kapoor S. 2013. AIB1 and its significant role in tumor pathogenesis in systemic malignancies: Beyond breast carcinomas. *Ann Oncol* 24(5):1414.
- Kim HJ, Litzenburger BC, Cui X, Delgado DA, Grabiner BC, Lin X, Lewis MT, Gottardis MM, Wong TW, Attar RM, et al. 2007. Constitutively active type I insulin-like growth factor receptor causes transformation and xenograft growth of immortalized mammary epithelial cells and is accompanied by an epithelial-to-mesenchymal transition mediated by NF-kappaB and snail. *Mol Cell Biol* 27(8):3165-75.
- Kishimoto M, Fujiki R, Takezawa S, Sasaki Y, Nakamura T, Yamaoka K, Kitagawa H, Kato S. 2006. Nuclear receptor mediated gene regulation through chromatin remodeling and histone modifications. *Endocr J* 53(2):157-72.
- Kleinberg DL, Feldman M, Ruan W. 2000. IGF-I: An essential factor in terminal end bud formation and ductal morphogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5(1):7-17.
- Kloting N, Koch L, Wunderlich T, Kern M, Ruschke K, Krone W, Bruning JC, Bluher M. 2008. Autocrine IGF-1 action in adipocytes controls systemic IGF-1 concentrations and growth. *Diabetes* 57(8):2074-82.
- Kremsdorf D, Soussan P, Paterlini-Brechot P, Brechot C. 2006. Hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: Paradigms for viral-related human carcinogenesis. *Oncogene* 25(27):3823-33.
- Kuang SQ, Liao L, Wang S, Medina D, O'Malley BW, Xu J. 2005. Mice lacking the amplified in breast cancer 1/steroid receptor coactivator-3 are resistant to

- chemical carcinogen-induced mammary tumorigenesis. *Cancer Res* 65(17):7993-8002.
- Kuang SQ, Liao L, Zhang H, Lee AV, O'Malley BW, Xu J. 2004. AIB1/SRC-3 deficiency affects insulin-like growth factor I signaling pathway and suppresses v-ha-ras-induced breast cancer initiation and progression in mice. *Cancer Res* 64(5):1875-85.
- Kumar R and Thompson EB. 1999. The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids* 64(5):310-9.
- Kurebayashi J, Otsuki T, Kunisue H, Tanaka K, Yamamoto S, Sonoo H. 2000. Expression levels of estrogen receptor-alpha, estrogen receptor-beta, coactivators, and corepressors in breast cancer. *Clin Cancer Res* 6(2):512-8.
- Kuribayashi A, Kataoka K, Kurabayashi T, Miura M. 2004. Evidence that basal activity, but not transactivation, of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase is required for insulin-like growth factor I-induced activation of extracellular signal-regulated kinase in oral carcinoma cells. *Endocrinology* 145(11):4976-84.
- Lahusen T, Henke RT, Kagan BL, Wellstein A, Riegel AT. 2009. The role and regulation of the nuclear receptor co-activator AIB1 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 116(2):225-37.
- Lahusen T, Fereshteh M, Oh A, Wellstein A, Riegel AT. 2007. Epidermal growth factor receptor tyrosine phosphorylation and signaling controlled by a nuclear receptor coactivator, amplified in breast cancer 1. *Cancer Res* 67(15):7256-65.
- Lambe M, Hsieh C, Trichopoulos D, Ekblom A, Pavia M, Adami HO. 1994. Transient increase in the risk of breast cancer after giving birth. *N Engl J Med* 331(1):5-9.
- Lauritsen KJ, List HJ, Reiter R, Wellstein A, Riegel AT. 2002. A role for TGF-beta in estrogen and retinoid mediated regulation of the nuclear receptor coactivator AIB1 in MCF-7 breast cancer cells. *Oncogene* 21(47):7147-55.
- Lee SK, Kim HJ, Kim JW, Lee JW. 1999. Steroid receptor coactivator-1 and its family members differentially regulate transactivation by the tumor suppressor protein p53. *Mol Endocrinol* 13(11):1924-33.
- Lee TH, Seng S, Sekine M, Hinton C, Fu Y, Avraham HK, Avraham S. 2007. Vascular endothelial growth factor mediates intracrine survival in human

- breast carcinoma cells through internally expressed VEGFR1/FLT1. *PLoS Med* 4(6):e186.
- Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, Pietersenpol JA. 2011. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* 121(7):2750-67.
- Lemmon MA, Schlessinger J, Ferguson KM. 2014. The EGFR family: Not so prototypical receptor tyrosine kinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6(4):a020768.
- LeRoith D and Roberts CT, Jr. 2003. The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Lett* 195(2):127-37.
- Lewis A, Kang R, Levine A, Maghami E. 2015. The new face of head and neck cancer: The HPV epidemic. *Oncology (Williston Park)* 29(9):213344.
- Li H, Gomes PJ, Chen JD. 1997. RAC3, a steroid/nuclear receptor-associated coactivator that is related to SRC-1 and TIF2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(16):8479-84.
- Li J, Liu YH, Ou S, Dai XM, Wang JP, Su YP. 2012. Steroid receptor coactivator-3 differentially regulates the inflammatory response in peritoneal macrophages. *Mol Med Rep* 5(4):1099-105.
- Li LB, Louie MC, Chen HW, Zou JX. 2008. Proto-oncogene ACTR/AIB1 promotes cancer cell invasion by up-regulating specific matrix metalloproteinase expression. *Cancer Lett* 261(1):64-73.
- Li X, Lonard DM, Jung SY, Malovannaya A, Feng Q, Qin J, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. 2006. The SRC-3/AIB1 coactivator is degraded in a ubiquitin- and ATP-independent manner by the REGgamma proteasome. *Cell* 124(2):381-92.
- Liao L, Chen X, Wang S, Parlow AF, Xu J. 2008. Steroid receptor coactivator 3 maintains circulating insulin-like growth factor I (IGF-I) by controlling IGF-binding protein 3 expression. *Mol Cell Biol* 28(7):2460-9.
- Liao L, Kuang SQ, Yuan Y, Gonzalez SM, O'Malley BW, Xu J. 2002. Molecular structure and biological function of the cancer-amplified nuclear receptor coactivator SRC-3/AIB1. *J Steroid Biochem Mol Biol* 83(1-5):3-14.

- List HJ, Lauritsen KJ, Reiter R, Powers C, Wellstein A, Riegel AT. 2001. Ribozyme targeting demonstrates that the nuclear receptor coactivator AIB1 is a rate-limiting factor for estrogen-dependent growth of human MCF-7 breast cancer cells. *J Biol Chem* 276(26):23763-8.
- Liu G, Cheres P, Kamp DW. 2013. Molecular basis of asbestos-induced lung disease. *Annu Rev Pathol* 8:161-87.
- Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A. 1993. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 75(1):59-72.
- Liu MZ, Xie D, Mai SJ, Tong ZT, Shao JY, Fu YS, Xia WJ, Kung HF, Guan XY, Zeng YX. 2008. Overexpression of AIB1 in nasopharyngeal carcinomas correlates closely with advanced tumor stage. *Am J Clin Pathol* 129(5):728-34.
- Liu Z, Liao L, Zhou S, Xu J. 2008. Generation and validation of a mouse line with a floxed SRC-3/AIB1 allele for conditional knockout. *Int J Biol Sci* 4(4):202-7.
- Loladze AV, Stull MA, Rowzee AM, Demarco J, Lantry JH, 3rd, Rosen CJ, Leroith D, Wagner KU, Hennighausen L, Wood TL. 2006. Epithelial-specific and stage-specific functions of insulin-like growth factor-I during postnatal mammary development. *Endocrinology* 147(11):5412-23.
- Lonard DM and O'Malley BW. 2008. SRC-3 transcription-coupled activation, degradation, and the ubiquitin clock: Is there enough coactivator to go around in cells? *Sci Signal* 1(13):pe16.
- Long W, Yi P, Amazit L, LaMarca HL, Ashcroft F, Kumar R, Mancini MA, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. 2010. SRC-3Delta4 mediates the interaction of EGFR with FAK to promote cell migration. *Mol Cell* 37(3):321-32.
- Long W, Foulds CE, Qin J, Liu J, Ding C, Lonard DM, Solis LM, Wistuba II, Qin J, Tsai SY, et al. 2012. ERK3 signals through SRC-3 coactivator to promote human lung cancer cell invasion. *J Clin Invest* 122(5):1869-80.
- Louet JF, Coste A, Amazit L, Tannour-Louet M, Wu RC, Tsai SY, Tsai MJ, Auwerx J, O'Malley BW. 2006. Oncogenic steroid receptor coactivator-3 is a key regulator of the white adipogenic program. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(47):17868-73.

- Louie MC, Zou JX, Rabinovich A, Chen HW. 2004. ACTR/AIB1 functions as an E2F1 coactivator to promote breast cancer cell proliferation and antiestrogen resistance. *Mol Cell Biol* 24(12):5157-71.
- Louie MC, Revenko AS, Zou JX, Yao J, Chen HW. 2006. Direct control of cell cycle gene expression by proto-oncogene product ACTR, and its autoregulation underlies its transforming activity. *Mol Cell Biol* 26(10):3810-23.
- Lowe SW, Cepero E, Evan G. 2004. Intrinsic tumour suppression. *Nature* 432(7015):307-15.
- Lu P, Ewald AJ, Martin GR, Werb Z. 2008. Genetic mosaic analysis reveals FGF receptor 2 function in terminal end buds during mammary gland branching morphogenesis. *Dev Biol* 321(1):77-87.
- Ludwig T, Chapman DL, Papaioannou VE, Efstratiadis A. 1997. Targeted mutations of breast cancer susceptibility gene homologs in mice: Lethal phenotypes of Brca1, Brca2, Brca1/Brca2, Brca1/p53, and Brca2/p53 nullizygous embryos. *Genes Dev* 11(10):1226-41.
- Lund LR, Romer J, Thomasset N, Solberg H, Pyke C, Bissell MJ, Dano K, Werb Z. 1996. Two distinct phases of apoptosis in mammary gland involution: Proteinase-independent and -dependent pathways. *Development* 122(1):181-93.
- Luo JH, Xie D, Liu MZ, Chen W, Liu YD, Wu GQ, Kung HF, Zeng YX, Guan XY. 2008. Protein expression and amplification of AIB1 in human urothelial carcinoma of the bladder and overexpression of AIB1 is a new independent prognostic marker of patient survival. *Int J Cancer* 122(11):2554-61.
- Lydon JP and O'Malley BW. 2011. Minireview: Steroid receptor coactivator-3: A multifarious coregulator in mammary gland metastasis. *Endocrinology* 152(1):19-25.
- Ma G, Ren Y, Wang K, He J. 2011. SRC-3 has a role in cancer other than as a nuclear receptor coactivator. *Int J Biol Sci* 7(5):664-72.
- Macias H and Hinck L. 2012. Mammary gland development. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 1(4):533-57.
- Macleod K. 2000. Tumor suppressor genes. *Curr Opin Genet Dev* 10(1):81-93.
- Mani A, Oh AS, Bowden ET, Lahusen T, Lorick KL, Weissman AM, Schlegel R, Wellstein A, Riegel AT. 2006. E6AP mediates regulated proteasomal

- degradation of the nuclear receptor coactivator amplified in breast cancer 1 in immortalized cells. *Cancer Res* 66(17):8680-6.
- Marshman E and Streuli CH. 2002. Insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins in mammary gland function. *Breast Cancer Res* 4(6):231-9.
- Marshman E, Green KA, Flint DJ, White A, Streuli CH, Westwood M. 2003. Insulin-like growth factor binding protein 5 and apoptosis in mammary epithelial cells. *J Cell Sci* 116(Pt 4):675-82.
- McBryan J, Theissen SM, Byrne C, Hughes E, Cocchiglia S, Sande S, O'Hara J, Tibbitts P, Hill AD, Young LS. 2012. Metastatic progression with resistance to aromatase inhibitors is driven by the steroid receptor coactivator SRC-1. *Cancer Res* 72(2):548-59.
- Meissner M, Stein M, Urbich C, Reisinger K, Suske G, Staels B, Kaufmann R, Gille J. 2004. PPARalpha activators inhibit vascular endothelial growth factor receptor-2 expression by repressing Sp1-dependent DNA binding and transactivation. *Circ Res* 94(3):324-32.
- Mescher A. 2009. The female reproductive system: Introduction. In: Junqueira's basic histology: Text & atlas. 12th ed. McGraw-Hill Companies.
- Mo P, Zhou Q, Guan L, Wang Y, Wang W, Miao M, Tong Z, Li M, Majaz S, Liu Y, et al. 2014. Amplified in breast cancer 1 promotes colorectal cancer progression through enhancing notch signaling. *Oncogene* .
- Morimoto LM, White E, Chen Z, Chlebowski RT, Hays J, Kuller L, Lopez AM, Manson J, Margolis KL, Muti PC, et al. 2002. Obesity, body size, and risk of postmenopausal breast cancer: The women's health initiative (united states). *Cancer Causes Control* 13(8):741-51.
- Moser AR, Pitot HC, Dove WF. 1990. A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science* 247(4940):322-4.
- Murphy LC, Simon SL, Parkes A, Leygue E, Dotzlaw H, Snell L, Troup S, Adeyinka A, Watson PH. 2000. Altered expression of estrogen receptor coregulators during human breast tumorigenesis. *Cancer Res* 60(22):6266-71.
- Mussi P, Yu C, O'Malley BW, Xu J. 2006. Stimulation of steroid receptor coactivator-3 (SRC-3) gene overexpression by a positive regulatory loop of E2F1 and SRC-3. *Mol Endocrinol* 20(12):3105-19.

- Myers E, Hill AD, Kelly G, McDermott EW, O'Higgins NJ, Buggy Y, Young LS. 2005. Associations and interactions between ets-1 and ets-2 and coregulatory proteins, SRC-1, AIB1, and NCoR in breast cancer. *Clin Cancer Res* 11(6):2111-22.
- Na SY, Lee SK, Han SJ, Choi HS, Im SY, Lee JW. 1998. Steroid receptor coactivator-1 interacts with the p50 subunit and coactivates nuclear factor kappaB-mediated transactivations. *J Biol Chem* 273(18):10831-4.
- Nahta R, Yuan LX, Zhang B, Kobayashi R, Esteva FJ. 2005. Insulin-like growth factor-I receptor/human epidermal growth factor receptor 2 heterodimerization contributes to trastuzumab resistance of breast cancer cells. *Cancer Res* 65(23):11118-28.
- Oh A, List HJ, Reiter R, Mani A, Zhang Y, Gehan E, Wellstein A, Riegel AT. 2004. The nuclear receptor coactivator AIB1 mediates insulin-like growth factor I-induced phenotypic changes in human breast cancer cells. *Cancer Res* 64(22):8299-308.
- Oh AS, Lahusen JT, Chien CD, Fereshteh MP, Zhang X, Dakshanamurthy S, Xu J, Kagan BL, Wellstein A, Riegel AT. 2008. Tyrosine phosphorylation of the nuclear receptor coactivator AIB1/SRC-3 is enhanced by abl kinase and is required for its activity in cancer cells. *Mol Cell Biol* 28(21):6580-93.
- Oliveira AM, Ross JS, Fletcher JA. 2005. Tumor suppressor genes in breast cancer: The gatekeepers and the caretakers. *Am J Clin Pathol* 124 Suppl:S16-28.
- Ory V, Tassi E, Cavalli LR, Sharif GM, Saenz F, Baker T, Schmidt MO, Mueller SC, Furth PA, Wellstein A, et al. 2014. The nuclear coactivator amplified in breast cancer 1 maintains tumor-initiating cells during development of ductal carcinoma in situ. *Oncogene* 33(23):3033-42.
- Osborne CK. 1998. Tamoxifen in the treatment of breast cancer. *N Engl J Med* 339(22):1609-18.
- Osborne CK, Shou J, Massarweh S, Schiff R. 2005. Crosstalk between estrogen receptor and growth factor receptor pathways as a cause for endocrine therapy resistance in breast cancer. *Clin Cancer Res* 11(2 Pt 2):865s-70s.
- Osborne CK, Schiff R, Fuqua SA, Shou J. 2001. Estrogen receptor: Current understanding of its activation and modulation. *Clin Cancer Res* 7(12 Suppl):4338s,4342s; discussion 4411s-4412s.

- Osborne CK, Bardou V, Hopp TA, Chamness GC, Hilsenbeck SG, Fuqua SA, Wong J, Allred DC, Clark GM, Schiff R. 2003. Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 95(5):353-61.
- Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, Donner DB. 1999. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the akt serine-threonine kinase. *Nature* 401(6748):82-5.
- Pandini G, Mineo R, Frasca F, Roberts CT, Jr, Marcelli M, Vigneri R, Belfiore A. 2005. Androgens up-regulate the insulin-like growth factor-I receptor in prostate cancer cells. *Cancer Res* 65(5):1849-57.
- Park KJ, Krishnan V, O'Malley BW, Yamamoto Y, Gaynor RB. 2005. Formation of an IKKalpha-dependent transcription complex is required for estrogen receptor-mediated gene activation. *Mol Cell* 18(1):71-82.
- Pechisker A. Targeting your DNA with the Cre/lox system. *The Science Creative Quarterly*. Available from <http://www.scq.ubc.ca>.
- Pena-Chilet M, Martinez MT, Perez-Fidalgo JA, Peiro-Chova L, Oltra SS, Tormo E, Alonso-Yuste E, Martinez-Delgado B, Eroles P, Climent J, et al. 2014. MicroRNA profile in very young women with breast cancer. *BMC Cancer* 14:529,2407-14-529.
- Pepper MS, Baetens D, Mandriota SJ, Di Sanza C, Oikemus S, Lane TF, Soriano JV, Montesano R, Iruela-Arispe ML. 2000. Regulation of VEGF and VEGF receptor expression in the rodent mammary gland during pregnancy, lactation, and involution. *Dev Dyn* 218(3):507-24.
- Percharde M and Azuara V. 2013. Essential roles for the nuclear receptor coactivator Ncoa3 in pluripotency. *Cell Cycle* 12(2):195-6.
- Perkins ND. 2007. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(1):49-62.
- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, et al. 2000. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406(6797):747-52.
- Picard F, Gehin M, Annicotte J, Rocchi S, Champy MF, O'Malley BW, Chambon P, Auwerx J. 2002. SRC-1 and TIF2 control energy balance between white and brown adipose tissues. *Cell* 111(7):931-41.

- Planas-Silva MD, Shang Y, Donaher JL, Brown M, Weinberg RA. 2001. AIB1 enhances estrogen-dependent induction of cyclin D1 expression. *Cancer Res* 61(10):3858-62.
- Press MF, Sauter G, Bernstein L, Villalobos IE, Mirlacher M, Zhou JY, Wardeh R, Li YT, Guzman R, Ma Y, et al. 2005. Diagnostic evaluation of HER-2 as a molecular target: An assessment of accuracy and reproducibility of laboratory testing in large, prospective, randomized clinical trials. *Clin Cancer Res* 11(18):6598-607.
- ¿Qué es el cáncer? Cómo evoluciona. Causas del cáncer [Internet]: Sociedad española de oncología médica (SEOM); c2015 [cited 2015 09/28]. Available from: <http://www.seom.org>.
- Qin L, Liu Z, Chen H, Xu J. 2009. The steroid receptor coactivator-1 regulates twist expression and promotes breast cancer metastasis. *Cancer Res* 69(9):3819-27.
- Qin L, Liao L, Redmond A, Young L, Yuan Y, Chen H, O'Malley BW, Xu J. 2008. The AIB1 oncogene promotes breast cancer metastasis by activation of PEA3-mediated matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and MMP9 expression. *Mol Cell Biol* 28(19):5937-50.
- Radice P. 2002. Mutations of BRCA genes in hereditary breast and ovarian cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 21(3 Suppl):9-12.
- Ramirez A, Page A, Gandarillas A, Zanet J, Pibre S, Vidal M, Tusell L, Genesca A, Whitaker DA, Melton DW, et al. 2004. A keratin K5Cre transgenic line appropriate for tissue-specific or generalized cre-mediated recombination. *Genesis* 39(1):52-7.
- Reiter R, Oh AS, Wellstein A, Riegel AT. 2004. Impact of the nuclear receptor coactivator AIB1 isoform AIB1-Delta3 on estrogenic ligands with different intrinsic activity. *Oncogene* 23(2):403-9.
- Richards RG, Klotz DM, Walker MP, Diaugustine RP. 2004. Mammary gland branching morphogenesis is diminished in mice with a deficiency of insulin-like growth factor-I (IGF-I), but not in mice with a liver-specific deletion of IGF-I. *Endocrinology* 145(7):3106-10.
- Richert MM and Wood TL. 1999. The insulin-like growth factors (IGF) and IGF type I receptor during postnatal growth of the murine mammary gland: Sites of messenger ribonucleic acid expression and potential functions. *Endocrinology* 140(1):454-61.

- Richert MM, Schwertfeger KL, Ryder JW, Anderson SM. 2000. An atlas of mouse mammary gland development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5(2):227-41.
- Richter S, Vandezande K, Chen N, Zhang K, Sutherland J, Anderson J, Han L, Panton R, Branco P, Gallie B. 2003. Sensitive and efficient detection of RB1 gene mutations enhances care for families with retinoblastoma. *Am J Hum Genet* 72(2):253-69.
- Roberts DL, Dive C, Renehan AG. 2010. Biological mechanisms linking obesity and cancer risk: New perspectives. *Annu Rev Med* 61:301-16.
- Rowzee AM, Lazzarino DA, Rota L, Sun Z, Wood TL. 2008. IGF ligand and receptor regulation of mammary development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 13(4):361-70.
- Russo J, Gusterson BA, Rogers AE, Russo IH, Wellings SR, van Zwieten MJ. 1990. Comparative study of human and rat mammary tumorigenesis. *Lab Invest* 62(3):244-78.
- Sakaguchi H, Fujimoto J, Sun WS, Tamaya T. 2007. Clinical implications of steroid receptor coactivator (SRC)-3 in uterine endometrial cancers. *J Steroid Biochem Mol Biol* 104(3-5):237-40.
- Sakakura C, Hagiwara A, Yasuoka R, Fujita Y, Nakanishi M, Masuda K, Kimura A, Nakamura Y, Inazawa J, Abe T, et al. 2000. Amplification and over-expression of the AIB1 nuclear receptor co-activator gene in primary gastric cancers. *Int J Cancer* 89(3):217-23.
- Samani AA, Yakar S, LeRoith D, Brodt P. 2007. The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: Overview and recent insights. *Endocr Rev* 28(1):20-47.
- Sarfstein R and Werner H. 2013. Minireview: Nuclear insulin and insulin-like growth factor-1 receptors: A novel paradigm in signal transduction. *Endocrinology* 154(5):1672-9.
- Sarfstein R, Maor S, Reizner N, Abramovitch S, Werner H. 2006. Transcriptional regulation of the insulin-like growth factor-I receptor gene in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol* 252(1-2):241-6.
- Satyanarayana A, Manns MP, Rudolph KL. 2004. Telomeres, telomerase and cancer: An endless search to target the ends. *Cell Cycle* 3(9):1138-50.

- Schiff R, Massarweh S, Shou J, Osborne CK. 2003. Breast cancer endocrine resistance: How growth factor signaling and estrogen receptor coregulators modulate response. *Clin Cancer Res* 9(1 Pt 2):447S-54S.
- Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. 2007. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 370(9590):890-907.
- Schnitt SJ. 2010. Classification and prognosis of invasive breast cancer: From morphology to molecular taxonomy. *Mod Pathol* 23 Suppl 2:S60-4.
- Schoeffner DJ, Matheny SL, Akahane T, Factor V, Berry A, Merlino G, Thorgeirsson UP. 2005. VEGF contributes to mammary tumor growth in transgenic mice through paracrine and autocrine mechanisms. *Lab Invest* 85(5):608-23.
- Schulz TJ, Glaubitz M, Kuhlow D, Thierbach R, Birringer M, Steinberg P, Pfeiffer AF, Ristow M. 2007. Variable expression of cre recombinase transgenes precludes reliable prediction of tissue-specific gene disruption by tail-biopsy genotyping. *PLoS One* 2(10):e1013.
- Senoret V, Orlando L, Brunning J, Font de Mora J. 2012. Igf1r is not required for AIB1-induced mammary hyperplasia and ductal branching. *Front Biosci (Elite Ed)* 4:2536-45.
- Shalita-Chesner M, Glaser T, Werner H. 2004. Signal transducer and activator of transcription-1 (STAT1), but not STAT5b, regulates IGF-I receptor gene expression in an osteosarcoma cell line. *J Pediatr Endocrinol Metab* 17(2):211-8.
- Shang Y and Brown M. 2002. Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs. *Science* 295(5564):2465-8.
- Shang Y, Hu X, DiRenzo J, Lazar MA, Brown M. 2000. Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell* 103(6):843-52.
- Shen Y and White E. 2001. P53-dependent apoptosis pathways. *Adv Cancer Res* 82:55-84.
- Shi J, Liu W, Sui F, Lu R, He Q, Yang Q, Lv H, Shi B, Hou P. 2015. Frequent amplification of AIB1, a critical oncogene modulating major signaling pathways, is associated with poor survival in gastric cancer. *Oncotarget* 6(16):14344-59.

- Shiau AK, Barstad D, Loria PM, Cheng L, Kushner PJ, Agard DA, Greene GL. 1998. The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* 95(7):927-37.
- Shibuya M. 2001. Structure and dual function of vascular endothelial growth factor receptor-1 (flt-1). *Int J Biochem Cell Biol* 33(4):409-20.
- Siegel PM, Ryan ED, Cardiff RD, Muller WJ. 1999. Elevated expression of activated forms of Neu/ErbB-2 and ErbB-3 are involved in the induction of mammary tumors in transgenic mice: Implications for human breast cancer. *Embo j* 18(8):2149-64.
- Silha JV and Murphy LJ. 2005. Insulin-like growth factor binding proteins in development. *Adv Exp Med Biol* 567:55-89.
- Sinn E, Muller W, Pattengale P, Tepler I, Wallace R, Leder P. 1987. Coexpression of MMTV/v-ha-ras and MMTV/c-myc genes in transgenic mice: Synergistic action of oncogenes in vivo. *Cell* 49(4):465-75.
- Snyder R. 2012. Leukemia and benzene. *Int J Environ Res Public Health* 9(8):2875-93.
- Song X, Zhang C, Zhao M, Chen H, Liu X, Chen J, Lonard DM, Qin L, Xu J, Wang X, et al. 2015. Steroid receptor coactivator-3 (SRC-3/AIB1) as a novel therapeutic target in triple negative breast cancer and its inhibition with a phospho-bufalin prodrug. *PLoS One* 10(10):e0140011.
- Spencer TE, Jenster G, Burcin MM, Allis CD, Zhou J, Mizzen CA, McKenna NJ, Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ, et al. 1997. Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* 389(6647):194-8.
- Stephens PJ, Greenman CD, Fu B, Yang F, Bignell GR, Mudie LJ, Pleasance ED, Lau KW, Beare D, Stebbings LA, et al. 2011. Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell* 144(1):27-40.
- Sternlicht MD, Kouros-Mehr H, Lu P, Werb Z. 2006. Hormonal and local control of mammary branching morphogenesis. *Differentiation* 74(7):365-81.
- Strange KS, Wilkinson D, Emerman JT. 2002. Mitogenic properties of insulin-like growth factors I and II, insulin-like growth factor binding protein-3 and epidermal growth factor on human breast epithelial cells in primary culture. *Breast Cancer Res Treat* 75(3):203-12.

- Stratakis CA. 2003. Genetics of adrenocortical tumors: Gatekeepers, landscapers and conductors in symphony. *Trends Endocrinol Metab* 14(9):404-10.
- Surmacz E. 2000. Function of the IGF-I receptor in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5(1):95-105.
- Tabarestani S, Ghaderian SM, Rezvani H, Mirfakhraie R. 2014. Expression profiling of breast cancer patients treated with tamoxifen: Prognostic or predictive significance. *Med Oncol* 31(4):896,014-0896-5. Epub 2014 Feb 22.
- Takeshita A, Cardona GR, Koibuchi N, Suen CS, Chin WW. 1997. TRAM-1, A novel 160-kDa thyroid hormone receptor activator molecule, exhibits distinct properties from steroid receptor coactivator-1. *J Biol Chem* 272(44):27629-34.
- Tanner MM, Grenman S, Koul A, Johannsson O, Meltzer P, Pejovic T, Borg A, Isola JJ. 2000. Frequent amplification of chromosomal region 20q12-q13 in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 6(5):1833-9.
- Teng MW, Swann JB, Koebel CM, Schreiber RD, Smyth MJ. 2008. Immune-mediated dormancy: An equilibrium with cancer. *J Leukoc Biol* 84(4):988-93.
- Tetel MJ and Acharya KD. 2013. Nuclear receptor coactivators: Regulators of steroid action in brain and behaviour. *J Neuroendocrinol* 25(11):1209-18.
- Thorat MA, Turbin D, Morimiya A, Leung S, Zhang Q, Jeng MH, Huntsman DG, Nakshatri H, Badve S. 2008. Amplified in breast cancer 1 expression in breast cancer. *Histopathology* 53(6):634-41.
- Tien JC and Xu J. 2012. Steroid receptor coactivator-3 as a potential molecular target for cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* 16(11):1085-96.
- Tien JC, Zhou S, Xu J. 2009. The role of SRC-1 in murine prostate carcinogenesis is nonessential due to a possible compensation of SRC-3/AIB1 overexpression. *Int J Biol Sci* 5(3):256-64.
- Tien JC, Liao L, Liu Y, Liu Z, Lee DK, Wang F, Xu J. 2014. The steroid receptor coactivator-3 is required for developing neuroendocrine tumor in the mouse prostate. *Int J Biol Sci* 10(10):1116-27.
- Tilli MT, Reiter R, Oh AS, Henke RT, McDonnell K, Gallicano GI, Furth PA, Riegel AT. 2005. Overexpression of an N-terminally truncated isoform of the nuclear receptor coactivator amplified in breast cancer 1 leads to altered proliferation of mammary epithelial cells in transgenic mice. *Mol Endocrinol* 19(3):644-56.

- Torres-Arzayus MI, Font de Mora J, Yuan J, Vazquez F, Bronson R, Rue M, Sellers WR, Brown M. 2004. High tumor incidence and activation of the PI3K/AKT pathway in transgenic mice define AIB1 as an oncogene. *Cancer Cell* 6(3):263-74.
- Tremblay F, Revett T, Huard C, Zhang Y, Tobin JF, Martinez RV, Gimeno RE. 2009. Bidirectional modulation of adipogenesis by the secreted protein Ccdc80/DRO1/URB. *J Biol Chem* 284(12):8136-47.
- Vorbach C, Capecchi MR, Penninger JM. 2006. Evolution of the mammary gland from the innate immune system? *Bioessays* 28(6):606-16.
- Wagner KU, McAllister K, Ward T, Davis B, Wiseman R, Hennighausen L. 2001. Spatial and temporal expression of the cre gene under the control of the MMTV-LTR in different lines of transgenic mice. *Transgenic Res* 10(6):545-53.
- Wagner KU, Wall RJ, St-Onge L, Gruss P, Wynshaw-Boris A, Garrett L, Li M, Furth PA, Hennighausen L. 1997. Cre-mediated gene deletion in the mammary gland. *Nucleic Acids Res* 25(21):4323-30.
- Wang LH, Yang XY, Zhang X, An P, Kim HJ, Huang J, Clarke R, Osborne CK, Inman JK, Appella E, et al. 2006. Disruption of estrogen receptor DNA-binding domain and related intramolecular communication restores tamoxifen sensitivity in resistant breast cancer. *Cancer Cell* 10(6):487-99.
- Wang S, Yuan Y, Liao L, Kuang SQ, Tien JC, O'Malley BW, Xu J. 2009. Disruption of the SRC-1 gene in mice suppresses breast cancer metastasis without affecting primary tumor formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(1):151-6.
- Wang W, Bian K, Vallabhaneni S, Zhang B, Wu RC, O'Malley BW, Long W. 2014. ERK3 promotes endothelial cell functions by upregulating SRC-3/SP1-mediated VEGFR2 expression. *J Cell Physiol* 229(10):1529-37.
- Wang Y, Lonard DM, Yu Y, Chow DC, Palzkill TG, O'Malley BW. 2011. Small molecule inhibition of the steroid receptor coactivators, SRC-3 and SRC-1. *Mol Endocrinol* 25(12):2041-53.
- Wang Y, Lonard DM, Yu Y, Chow DC, Palzkill TG, Wang J, Qi R, Matzuk AJ, Song X, Madoux F, et al. 2014. Bufalin is a potent small-molecule inhibitor of the steroid receptor coactivators SRC-3 and SRC-1. *Cancer Res* 74(5):1506-17.

- Wang Z, Rose DW, Hermanson O, Liu F, Herman T, Wu W, Szeto D, Gleiberman A, Kronen A, Pratt K, et al. 2000. Regulation of somatic growth by the p160 coactivator p/CIP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(25):13549-54.
- Weigand M, Hantel P, Kreienberg R, Waltenberger J. 2005. Autocrine vascular endothelial growth factor signalling in breast cancer. evidence from cell lines and primary breast cancer cultures in vitro. *Angiogenesis* 8(3):197-204.
- Weiss RE, Xu J, Ning G, Pohlenz J, O'Malley BW, Refetoff S. 1999. Mice deficient in the steroid receptor co-activator 1 (SRC-1) are resistant to thyroid hormone. *Embo j* 18(7):1900-4.
- Werbajh S, Nojek I, Lanz R, Costas MA. 2000. RAC-3 is a NF-kappa B coactivator. *FEBS Lett* 485(2-3):195-9.
- Wu MY, Fu J, Xu J, O'Malley BW, Wu RC. 2012. Steroid receptor coactivator 3 regulates autophagy in breast cancer cells through macrophage migration inhibitory factor. *Cell Res* 22(6):1003-21.
- Wu RC, Feng Q, Lonard DM, O'Malley BW. 2007. SRC-3 coactivator functional lifetime is regulated by a phospho-dependent ubiquitin time clock. *Cell* 129(6):1125-40.
- Wu RC, Qin J, Yi P, Wong J, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. 2004. Selective phosphorylations of the SRC-3/AIB1 coactivator integrate genomic responses to multiple cellular signaling pathways. *Mol Cell* 15(6):937-49.
- Wu RC, Qin J, Hashimoto Y, Wong J, Xu J, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. 2002. Regulation of SRC-3 (pCIP/ACTR/AIB-1/RAC-3/TRAM-1) coactivator activity by I kappa B kinase. *Mol Cell Biol* 22(10):3549-61.
- Xie D, Sham JS, Zeng WF, Lin HL, Bi J, Che LH, Hu L, Zeng YX, Guan XY. 2005. Correlation of AIB1 overexpression with advanced clinical stage of human colorectal carcinoma. *Hum Pathol* 36(7):777-83.
- Xu FP, Xie D, Wen JM, Wu HX, Liu YD, Bi J, Lv ZL, Zeng YX, Guan XY. 2007. SRC-3/AIB1 protein and gene amplification levels in human esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer Lett* 245(1-2):69-74.
- Xu J. 2003. The role of SRC-3 in estrogen-dependent vasoprotection during vascular wall remodeling postinjury. *Nucl Recept Signal* 1:e002.
- Xu J, Wu RC, O'Malley BW. 2009. Normal and cancer-related functions of the p160 steroid receptor co-activator (SRC) family. *Nat Rev Cancer* 9(9):615-30.

- Xu J, Liao L, Ning G, Yoshida-Komiya H, Deng C, O'Malley BW. 2000. The steroid receptor coactivator SRC-3 (p/CIP/RAC3/AIB1/ACTR/TRAM-1) is required for normal growth, puberty, female reproductive function, and mammary gland development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(12):6379-84.
- Xu X, Wagner KU, Larson D, Weaver Z, Li C, Ried T, Hennighausen L, Wynshaw-Boris A, Deng CX. 1999. Conditional mutation of *Brca1* in mammary epithelial cells results in blunted ductal morphogenesis and tumour formation. *Nat Genet* 22(1):37-43.
- Xu Y, Chen Q, Li W, Su X, Chen T, Liu Y, Zhao Y, Yu C. 2010. Overexpression of transcriptional coactivator AIB1 promotes hepatocellular carcinoma progression by enhancing cell proliferation and invasiveness. *Oncogene* 29(23):3386-97.
- Yan J, Tsai SY, Tsai MJ. 2006. SRC-3/AIB1: Transcriptional coactivator in oncogenesis. *Acta Pharmacol Sin* 27(4):387-94.
- Yan J, Yu CT, Ozen M, Ittmann M, Tsai SY, Tsai MJ. 2006. Steroid receptor coactivator-3 and activator protein-1 coordinately regulate the transcription of components of the insulin-like growth factor/AKT signaling pathway. *Cancer Res* 66(22):11039-46.
- Yan J, Erdem H, Li R, Cai Y, Ayala G, Ittmann M, Yu-Lee LY, Tsai SY, Tsai MJ. 2008. Steroid receptor coactivator-3/AIB1 promotes cell migration and invasiveness through focal adhesion turnover and matrix metalloproteinase expression. *Cancer Res* 68(13):5460-8.
- Yang C, Li S, Wang M, Chang AK, Liu Y, Zhao F, Xiao L, Han L, Wang D, Li S, et al. 2013. PTEN suppresses the oncogenic function of AIB1 through decreasing its protein stability via mechanism involving Fbw7 alpha. *Mol Cancer* 12:21,4598-12-21.
- Yang H, Ye D, Guan KL, Xiong Y. 2012. IDH1 and IDH2 mutations in tumorigenesis: Mechanistic insights and clinical perspectives. *Clin Cancer Res* 18(20):5562-71.
- Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA. 2004. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 117(7):927-39.

- Yang L, Pang Y, Moses HL. 2010. TGF-beta and immune cells: An important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol* 31(6):220-7.
- Yi P, Xia W, Wu RC, Lonard DM, Hung MC, O'Malley BW. 2013. SRC-3 coactivator regulates cell resistance to cytotoxic stress via TRAF4-mediated p53 destabilization. *Genes Dev* 27(3):274-87.
- Ying H, Willingham MC, Cheng SY. 2008. The steroid receptor coactivator-3 is a tumor promoter in a mouse model of thyroid cancer. *Oncogene* 27(6):823-30.
- Ying H, Furuya F, Willingham MC, Xu J, O'Malley BW, Cheng SY. 2005. Dual functions of the steroid hormone receptor coactivator 3 in modulating resistance to thyroid hormone. *Mol Cell Biol* 25(17):7687-95.
- York B and O'Malley BW. 2010. Steroid receptor coactivator (SRC) family: Masters of systems biology. *J Biol Chem* 285(50):38743-50.
- York B, Yu C, Sagen JV, Liu Z, Nikolai BC, Wu RC, Finegold M, Xu J, O'Malley BW. 2010. Reprogramming the posttranslational code of SRC-3 confers a switch in mammalian systems biology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(24):11122-7.
- Yoshida H, Liu J, Samuel S, Cheng W, Rosen D, Naora H. 2005. Steroid receptor coactivator-3, a homolog of taiman that controls cell migration in the drosophila ovary, regulates migration of human ovarian cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 245(1-2):77-85.
- Yoshiji H, Gomez DE, Shibuya M, Thorgeirsson UP. 1996. Expression of vascular endothelial growth factor, its receptor, and other angiogenic factors in human breast cancer. *Cancer Res* 56(9):2013-6.
- Yu C, York B, Wang S, Feng Q, Xu J, O'Malley BW. 2007. An essential function of the SRC-3 coactivator in suppression of cytokine mRNA translation and inflammatory response. *Mol Cell* 25(5):765-78.
- Yuan Y, Liao L, Tulis DA, Xu J. 2002. Steroid receptor coactivator-3 is required for inhibition of neointima formation by estrogen. *Circulation* 105(22):2653-9.
- Zaragoza R, Garcia-Trevijano ER, Lluch A, Ribas G, Vina JR. 2015. Involvement of different networks in mammary gland involution after the pregnancy/lactation cycle: Implications in breast cancer. *IUBMB Life* 67(4):227-38.

- Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ. 1996. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 87(4):619-28.
- Zhang C, Moore LM, Li X, Yung WK, Zhang W. 2013. IDH1/2 mutations target a key hallmark of cancer by deregulating cellular metabolism in glioma. *Neuro Oncol* 15(9):1114-26.
- Zhang N, Fang Z, Contag PR, Purchio AF, West DB. 2004. Tracking angiogenesis induced by skin wounding and contact hypersensitivity using a Vegfr2-luciferase transgenic mouse. *Blood* 103(2):617-26.
- Zhao C, Yasui K, Lee CJ, Kurioka H, Hosokawa Y, Oka T, Inazawa J. 2003. Elevated expression levels of NCOA3, TOP1, and TFAP2C in breast tumors as predictors of poor prognosis. *Cancer* 98(1):18-23.
- Zheng FF, Wu RC, Smith CL, O'Malley BW. 2005. Rapid estrogen-induced phosphorylation of the SRC-3 coactivator occurs in an extranuclear complex containing estrogen receptor. *Mol Cell Biol* 25(18):8273-84.
- Zhou HJ, Yan J, Luo W, Ayala G, Lin SH, Erdem H, Ittmann M, Tsai SY, Tsai MJ. 2005. SRC-3 is required for prostate cancer cell proliferation and survival. *Cancer Res* 65(17):7976-83.

